

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

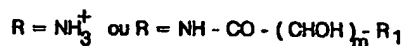
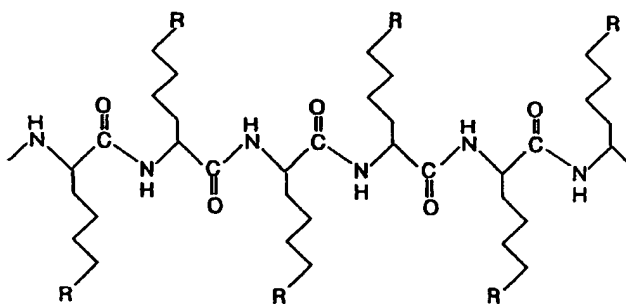
(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/87, A61K 47/48, 48/00, C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/30020
			(43) Date de publication internationale: 9 novembre 1995 (09.11.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00535 (22) Date de dépôt international: 24 avril 1995 (24.04.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/05174 28 avril 1994 (28.04.94) FR (60) Brevet ou demande principal(e) (63) Apparenté(e) par continuation US 08/288,681 (CIP) Déposé(e) le 10 août 1994 (10.08.94) (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): I.D.M. IMMUNO-DESIGNED MOLECULES [FR/FR]; 128, boulevard Richard-Lenoir, F-75011 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MIDOUX, Patrick [FR/FR]; 21, rue du Poinçon, F-45100 Orléans (FR). ER-BACHER, Patrick [FR/FR]; 58, quai du Chatelet, F-45000 Orléans (FR). ROCHE-DEGREMONT, Annie-Claude [FR/FR]; 864, rue de Savigny, F-45640 Sandillon (FR). MONSIGNY, Michel [FR/FR]; 341, rue des Bouvreuils, F-45590 Saint-Cyr-en-Val (FR).		(74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L., 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR). (81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.	

(54) Title: NOVEL NUCLEIC ACID/POLYMER COMPLEXES, METHOD FOR PREPARING SAME AND USE THEREOF FOR CELL TRANSFECTION

(54) Titre: NOUVEAUX COMPLEXES D'ACIDE NUCLEIQUE ET DE POLYMER, LEUR PROCÉDE DE PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR LA TRANSFECTION DE CELLULES

(57) Abstract

A complex consisting of at least one negatively charged nucleic acid and at least one positively charged polymeric conjugate with an electrostatic bond therebetween, said polymeric conjugate containing a polymer made up of monomeric units supporting free NH_3^+ functions thereof, and being such that the free NH_3^+ functions of said units are substituted in a ratio of at least 10 %, advantageously 45-70 % and particularly 60 %, by uncharged residues causing a reduction in positive charges relative to the unsubstituted polymeric conjugate, whereby release of the nucleic acid by dissociation of the complex is facilitated; said residues also have the properties of comprising at least one hydroxyl group and not corresponding to any recognition signal recognised by a cell membrane receptor; and the free NH_3^+ functions of said units and/or the hydroxyl groups of said residues may also be substituted by at least one molecule forming a recognition signal recognised by a cell membrane receptor, with the proviso that the polymeric conjugate contains at least 30 % of the free NH_3^+ functions.



(57) Abrégé

L'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que: les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10 %, avantageusement de 45 % à 70 %, notamment de 60 %, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe, les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes: ils comportent au moins un groupe hydroxyle, ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30 % de fonctions NH_3^+ libres.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Sllovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

NOUVEAUX COMPLEXES D'ACIDE NUCLEIQUE ET DE POLYMER, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR LA TRANSFECTION DE CELLULES.

5 L'introduction d'un gène étranger dans une cellule est d'un grand intérêt pour la thérapie génique. Tandis que dans les expériences *in vitro*, des méthodes générales utilisant la précipitation par le phosphate de calcium, le dextran DEAE, ou les lipides cationiques sont appropriées, des méthodes plus sélectives sont nécessaires pour transférer de façon spécifique un gène dans
10 une population de cellules données, dans le but de développer une thérapie génique. Parmi ces méthodes sélectives, le transfert de gène peut être obtenu en utilisant, soit un matériel viral modifié, allant d'un virus de vaccine à un rétrovirus, soit des liposomes ciblés, soit des complexes de gènes et de macromolécules ciblés. Les complexes ADN/vecteurs tels que
15 asialoorosomucoïde, insuline ou transferrine liés à la polylysine ont été déjà proposés comme vecteurs guides de plasmides permettant la transfection de cellules selon un procédé d'endocytose induit par les récepteurs correspondants: le récepteur spécifique des galactosides (lectine) pour l'asialoorosomucoïde, le récepteur de l'insuline et le récepteur de la
20 transferrine.

Il a été établi que de nombreuses cellules animales possèdent des lectines membranaires [Monsigny M., Roche A.C., Kieda C., Midoux P., Obrenovitch A. Characterization and biological implications of membrane
lectins in tumor, lymphoid and myeloid cells. *Biochimie*, 1988: 70: 1633-49; Varki A. Selectin and other mammalian sialic acid binding lectins. *Curr. Op. Cell. Biol.*, 1992, 4: 257-66] qui reconnaissent spécifiquement des osides de structures diverses. En particulier, la lectine membranaire des cellules du parenchyme hépatique qui reconnaît des structures glucidiques comportant un
résidu galactose en position terminale, c'est-à-dire un galactose ayant toutes
25 ses fonctions alcooliques libres, ce qui est le cas de glycoprotéines sériques désialysées [Ashwell G., Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, 1982, 51: 531-54].

La spécificité de ces lectines dépend du type de cellules et par conséquent, les lectines membranaires sont de bons candidats pour le transfert
35 de gène par des complexes glycoconjugués/ADN comme porteurs spécifiques. Les glycoconjugués solubles portant des résidus de sucre définis ont été utilisés pour introduire efficacement des médicaments, y compris des drogues cytotoxiques, des toxines, des immunomodulateurs, des drogues antivirales

[Monsigny, M., Roche, A.C., Kieda, C., Midoux, P. and Obrenovitch, A. (1988) *Biochimie* 70: 1633-1649 2; Roche, A.C., Midoux, P., Pimpaneau, V., Nègre, E., Mayer, R. and Monsigny, M. (1990) *Res. Virol.* 141: 243-249] et des oligonucléotides [Bonfils E., Depierreux C., Midoux P., Thuong N.T., Monsigny M., Roche A.C. Drug targeting: synthesis and endocytosis of oligonucleotide-neoglycoprotein conjugates. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20: 4621-9; Bonfils E., Mendès C., Roche A.C., Monsigny M., Midoux P. Uptake by macrophages of a biotinylated oligo- α -deoxythymidylate by using mannosylated streptavidin. *Bioconjugate Chem.*, 1992, 3: 277-84].

10 Le transport des plasmides par des macromolécules susceptibles d'être reconnues spécifiquement par des composés de la membrane plasmique des cellules cibles relève d'une démarche imitant le mécanisme d'entrée du matériel génétique viral dans la cellule. Dans tous les cas décrits jusqu'à
15 présent, le complexe plasmide-transporteur macromoléculaire est reconnu spécifiquement par un récepteur membranaire qui entraîne le complexe dans des vésicules d'endocytose, dans des endosomes, et probablement dans d'autres compartiments intracellulaires plus profonds, éloignés de la membrane plasmique.

20 Cependant, le passage transmembranaire de l'ADN plasmidique est une étape critique vis à vis de la libération dudit ADN dans le cytosol et/ou le noyau, où le gène sera exprimé.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes stables d'acide nucléique et de polymère substitué.

25 L'invention a également pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitués susceptibles, en se dissociant, de relarguer l'acide nucléique, afin de permettre une bonne expression de l'acide nucléique dans les cellules.

30 L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué ne présentant pas de signaux de reconnaissance et susceptibles de transfecter plusieurs types de cellules.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué présentant des signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires, conférant un caractère sélectif de la transfection vis à vis de différents types cellulaires.

35 L'invention a pour objet un procédé de transfection spécifique *in vitro* ou *in vivo*.

L'invention a également pour objet de nouveaux conjugués de polylysine susceptibles d'être complexés à un acide nucléique en vue de la transfection sélective d'une cellule.

5 L'invention a également pour objet de nouvelles compositions pharmaceutiques contenant, à titre de substance active, un complexe d'ADN et de polymère substitué, notamment de polylysine substituée.

L'invention a également pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué possédant une haute solubilité dans le sérum physiologique et divers milieux de cultures, susceptibles d'être
10 administrés *in vivo* à des doses très élevées.

Dans une de ses définitions les plus générales, l'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique qui est chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le
15 conjugué polymérique contenant des motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, ce rapport étant déterminé par méthode colorimétrique (Fields R. (1971)
20 The measurement of amino groups on proteins and peptides. Biochem. J., 124: 581-590) ou avantageusement de 35% à 70%, notamment de 40%, ce rapport étant déterminé par résonance magnétique nucléaire (RMN), par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage
25 de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

30 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique, après substitution par les susdits résidus et par les susdits signaux de reconnaissance,
35 contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

L'originalité de l'invention repose sur l'utilisation d'un polymère substitué par une quantité suffisante de résidus permettant,

i) de former des complexes stables avec un acide nucléique, ARN et ADN, notamment l'ADN, par interactions électrostatiques avec les charges négatives de l'acide nucléique, notamment de l'ADN et le reste des charges positives du polymère substitué par les susdits résidus, et

5 ii) de faciliter la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique afin de permettre une bonne expression du gène dans les cellules.

En effet, le susdit polymère substitué permet une condensation de l'ADN qui reste très forte par suite d'un phénomène coopératif entre les charges positives et négatives du polymère et de l'ADN. Le polymère substitué par
10 exemple à 58% avec un susdit résidu possède moins de charges positives, ce qui réduit la coopérativité des interactions et facilite la dissociation entre l'ADN et le polymère.

La dissociation du complexe peut être mesurée dans les conditions décrites à propos de la figure 6.

15 Pris isolément, le conjugué polymérique contient des monomères portant des fonctions NH_2 libres, susceptibles dans les conditions de pH appropriées ($\text{pH} < 10$), de devenir NH_3^+ .

Par ailleurs, la présence d'un signal de reconnaissance membranaire cellulaire n'est pas obligatoire.

20 L'expression selon laquelle "les résidus substituant NH_3^+ ne correspondent à aucun signal de reconnaissance membranaire cellulaire" signifie qu'ils ne correspondent à aucun signal dans la mesure des connaissances actuelles de la littérature.

Par signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire
25 cellulaire, on désigne généralement une molécule ou un complexe moléculaire capable de reconnaître sélectivement un ligand (affinité signal-récepteur $\geq 10^3 \text{l/mole}$).

Le nombre de signaux de reconnaissance qui substituent les NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus varie
30 de 0 à 40%.

Etant donné que le nombre de NH_3^+ libres sur le conjugué polymérique doit être d'au moins 30%, lorsque les NH_3^+ des susdits motifs sont substitués par 10% de résidus non chargés notamment gluconoylé, les signaux de reconnaissance peuvent être jusqu'à 40% sur les 90% des NH_3^+ non engagés
35 avec des résidus non chargés et/ou sur les groupes hydroxyles des susdits résidus. Lorsque les NH_3^+ des susdits motifs sont substitués par 45% de résidus non chargés, les signaux de reconnaissance peuvent être sur 25 des 55% des NH_3^+ non engagés avec les résidus non chargés et/ou sur les

hydroxyles des susdits résidus. En revanche, lorsque le nombre de NH_3^+ engagés dans des liaisons avec les résidus augmente jusqu'à 70%, afin que le conjugué polymérique garde au moins 30% de NH_3^+ libres, les signaux de reconnaissance ne peuvent plus être que sur les hydroxyles des susdits résidus.

5 Le taux de substitution des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs par des résidus non chargés peut être déterminé selon 2 méthodes:

1°) une méthode colorimétrique après réaction de l'acide 2,4,6 trinitobenzène sulfonique (TNBS) (Fields R. (1971) The measurement of amino groups on proteins and peptides. Biochem. J., 124: 581-590) avec les
10 groupes ϵ -amino des résidus lysine libres de la polylysine gluconoylée par rapport à la polylysine non substituée;

le nombre moyen de résidus gluconoylé fixés par molécule de polylysine est obtenu par différence avec le nombre moyen de résidus lysine par molécule de polylysine;

15 2°) une méthode physique en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN); les spectres RMN sont réalisés à 300 MHz avec 4 mg de polylysine gluconoylée lyophilisée dans D_2O et repris dans 0,5 ml de D_2O (Figures 9 et 10);

le nombre moyen x de résidus gluconoylé fixés par molécule de polylysine est déterminée à partir de la relation:

$$x = 3/2 \cdot (h_{\text{GlcA}}/h_{\text{Lys}}) \cdot \text{DP}$$

où h_{Lys} est la valeur de l'intégration à 1,7 ppm correspondant aux 6 protons des carbones 3, 4 et 5 (Figure 1) d'un résidu lysine de la polylysine, h_{GlcA} est la valeur de l'intégration à 3,8 ppm correspondant à 4 protons d'un groupe
25 gluconoylé (Figures 9 et 10) et DP est le degré de polymérisation de la polylysine;

la formule ci-dessus est à adapter en fonction de la nature du résidu.

Il faut noter que la détermination du nombre de résidus non chargés sur le conjugué polymérique dépend de la méthode utilisée. Ce nombre est
30 surestimé lorsque l'on utilise le dosage colorimétrique qui permet de calculer par différence un nombre relatif de résidus non chargés sur le conjugué polymérique. En revanche, la RMN permet de calculer directement le nombre de résidus non chargés indépendamment de la concentration en conjugué polymérique.

35 Dans ce qui précède ou dans ce qui suit, sauf indications contraires, le taux de substitution des fonctions NH_3^+ libres est donné dans le cadre de la méthode colorimétrique.

L'invention concerne notamment un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,
- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:
 - ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 - ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

L'invention concerne notamment un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,
- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:
 - ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 - ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
- les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par

un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins
5 un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

10 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment d'environ 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant ainsi la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique,

15 - les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:
→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance de cellules,

20 - 0 à 40% du nombre des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs étant également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres,
et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance pouvant l'être à
25 raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

L'invention concerne plus particulièrement un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique
30 chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un
35 rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment d'environ 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant ainsi la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance membranaire cellulaire,

5 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000,

10 et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance pouvant l'être à raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

15 Dans ces conditions, compte tenu du faible nombre de signaux de reconnaissance, au moins 30% des NH_3^+ du conjugué polymérique sont libres.

 Lorsqu'ils sont présents, les signaux de reconnaissance ont pour but de conférer à la transfection la sélectivité de la transfection vis à vis de différents types cellulaires et de rendre efficace la transfection *in vivo*.

20 Les signaux de reconnaissance ont également pour effet, compte tenu de leur charge généralement neutre, d'entraîner une diminution des charges positives du conjugué polymérique.

 Les signaux de reconnaissance sont des molécules de petite masse moléculaire (< 5000 daltons).

25 Le nombre de molécules de signal de reconnaissance fixé sur le polymère modifié peut être,

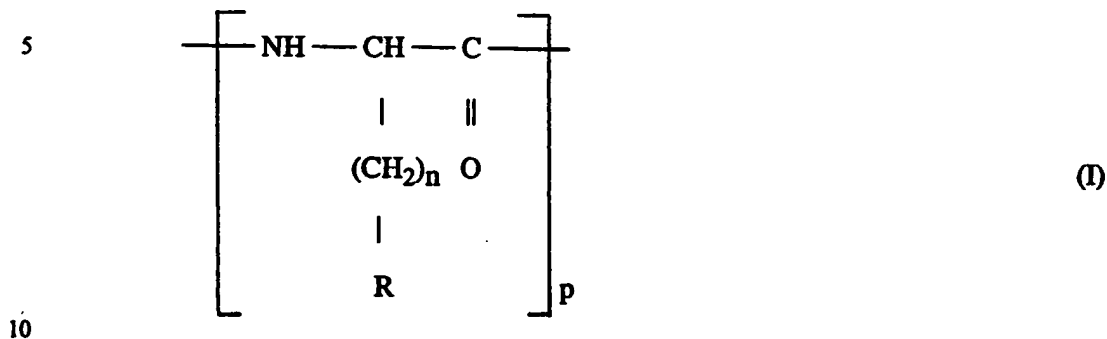
- pour une molécule signal de très haute affinité vis à vis de son récepteur, de 0,5 à 5, avantageusement 1 molécule pour environ 10 000 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 50 molécules de polymère substitué;

30 - pour une molécule signal de moyenne affinité vis à vis de son récepteur, d'environ 10 à environ 100, avantageusement 60 molécules pour environ 10 000 motifs monomères de polymère substitué.

 Une molécule signal de très haute affinité correspond à une valeur de K_a d'au moins 10^6 l/mole.

35 Une molécule signal de moyenne affinité correspond à une valeur de K_a d'au moins 10^4 l/mole.

Selon un mode de réalisation avantageux, dans les complexes de l'invention, le polymère contient un groupement polymérique de formule (I) suivante:



dans laquelle:

. p est un nombre entier variant de 2 à 500 de préférence de 150 à 200,

. n est un nombre entier variant de 1 à 5 et vaut de préférence 4,

. ce groupement polymérique contenant un nombre de p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment un reste dihydroxypropionyle, érythrononoyale, thréonoyale, ribonoyale, arabinoyale, xylonoyale, lyxonoyale, gluconoyale, galactonoyale, mannonyale, glycoheptonoyale, glycooctonoyale,

. m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7,

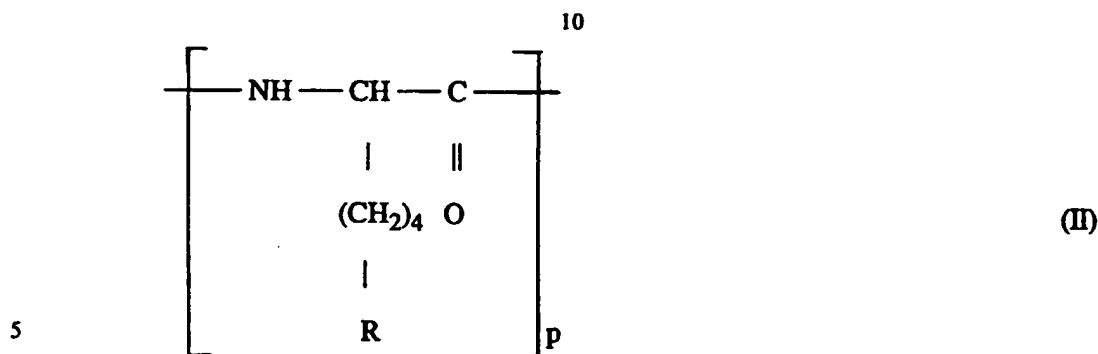
. R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 ,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ ,

* R pouvant en outre être constitué de 0 à 25% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres, et notamment à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour environ 10 000 motifs,

ou à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un complexe comme définit précédemment, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



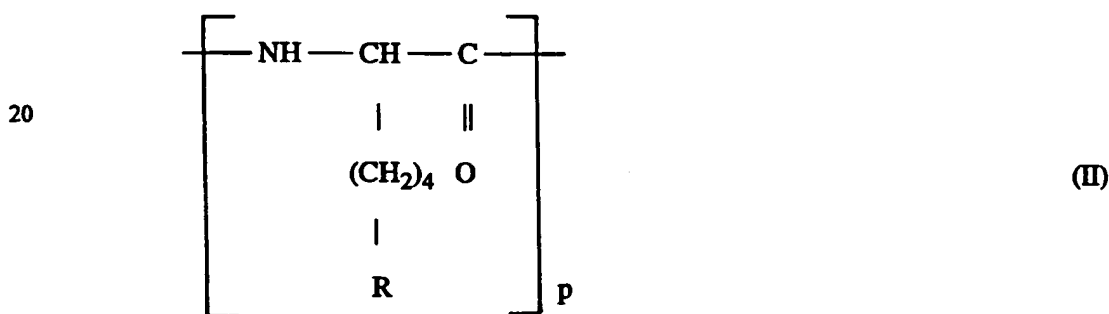
dans laquelle:

. p a les significations indiquées ci-dessus,

* 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe
 10 NH-CO-(CHOH)_m-R₁, m et R₁ ayant la signification indiquée ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des
 radicaux R représentent NH₃⁺, et de 0 à 25% des radicaux R pouvant être
 substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu
 par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué
 15 polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH₃⁺ libres.

Selon un autre mode de réalisation, dans les complexes de l'invention, le
 polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

. p a les significations indiquées ci-dessus,

* 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe
 NH-CO-(CHOH)_m-R₁, m et R₁ ayant la signification indiquée ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des
 30 radicaux R représentent NH₃⁺.

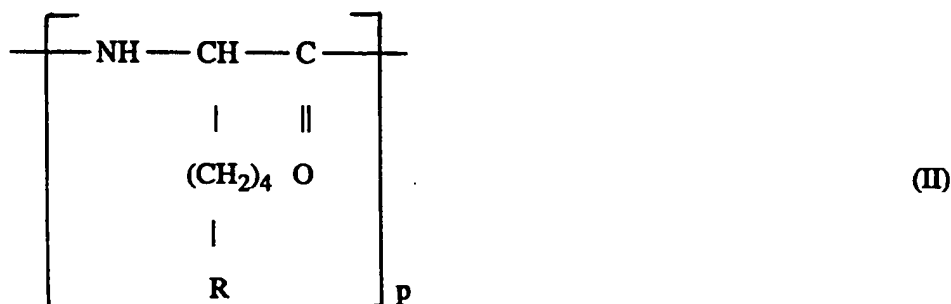
Dans cette classe de complexes de l'invention, le polymère est de la
 polylysine.

Comme le montrent les exemples, les cellules HepG2 (hépatocarcinome
 humain) sont efficacement transfectées par de la polylysine substituée par 58 ±

12% (110 ± 22 résidus) gluconoyles (environ 300 fois plus qu'avec le plasmide seul). Les polylysines substituées par peu ou trop de résidus gluconoyles sont pas ou peu efficaces pour obtenir une bonne transfection.

La polylysine substituée par $58 \pm 12\%$ de gluconoyles a permis de transférer différentes cellules (humaines et murines, adhérentes ou en suspension) avec une grande efficacité, modulée selon le type cellulaire et le promoteur utilisé.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans les complexes de l'invention, le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

p a la signification indiquée ci-dessus,

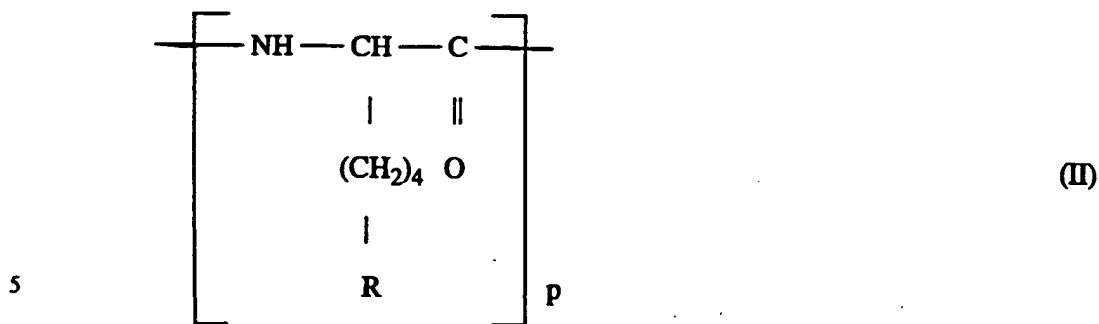
ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% des radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour 10 000 motifs.

Selon un autre mode de réalisation, dans les complexes de l'invention, le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):

12



dans laquelle:

. p a la signification indiquée ci-dessus,

10 . ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées ci-dessus,

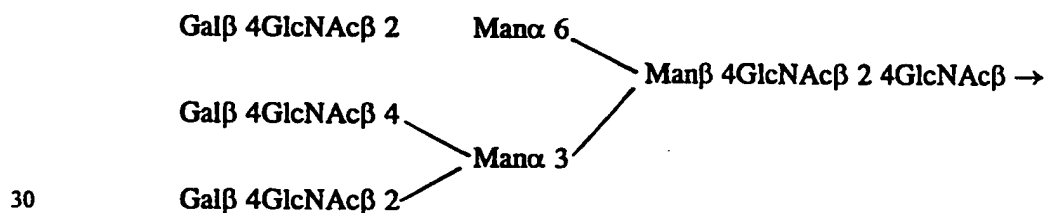
15 * le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% de ces radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

Dans les complexes de l'invention, le signal de reconnaissance peut être choisi parmi:

20 A) - des osides simples ou complexes reconnus par des lectines membranaires, et choisis parmi:

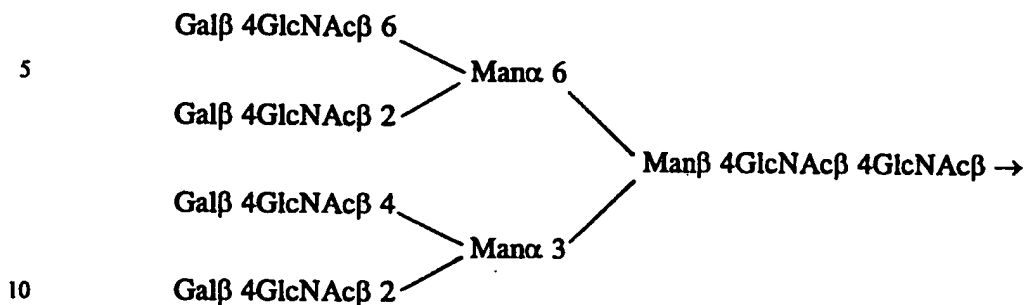
a. Asialo-oligoside de type triantennaire lactosamine: récepteur d'asialoglycoprotéine

25

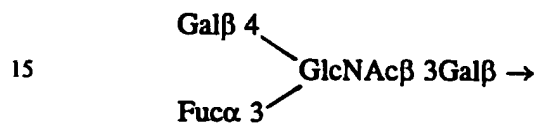


35

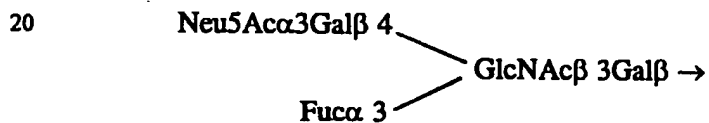
b. Asialo oligoside de type lactosamine tetraantennaire: récepteur d'asialoglycoprotéine



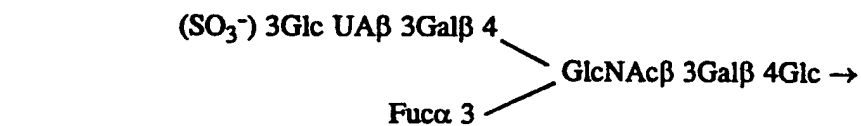
c. Lewis x: LECAM 2/3



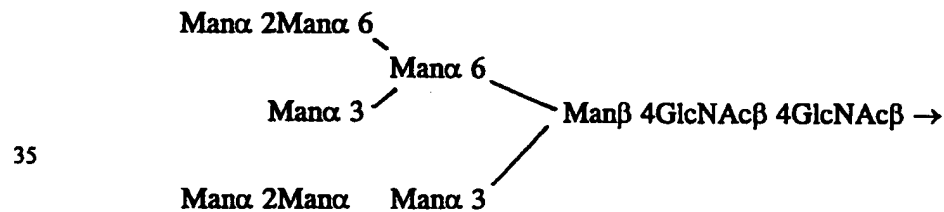
d. Lewis x sialyl: LECAM 3/2



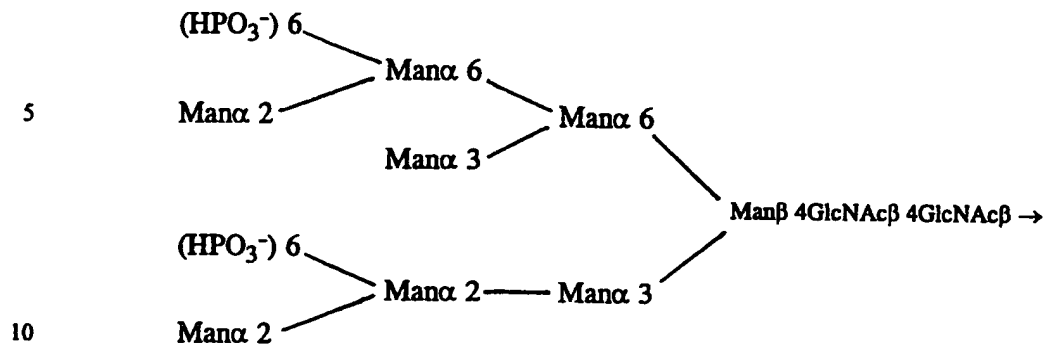
e. Dérivé de Lewis x sulfaté (HNK1): LECAM 1



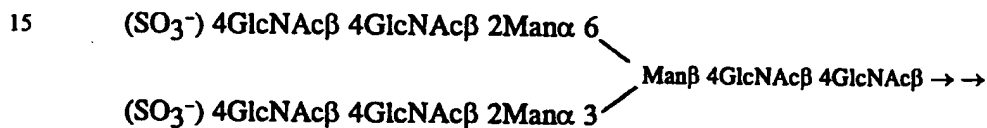
f. Oligomannoside: récepteur du mannose



g. Oligomannoside ph sph rylé: récepteur de mannose 6 phosphate



h. Oligosaccharide de type lactosamine sulfaté: récepteur de GalNAc 4 sulfaté



B) des peptides

20 a) peptides anti-inflammatoires ou certains de leurs fragments reconnus par des récepteurs de la paroi vasculaire, tels que par exemple:

- polypeptide vasodilatateur intestinal (VIP)

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH₂

- polypeptide atrial natriurétique (ANP)

25 SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

- lipocortine

HDMNKVLDL

- bradykinine

RPPGFSPFR;

30 b) peptides ligands des intégrines, tels que les peptides contenant la séquence RGD tel que le récepteur de la fibronectine;

c) facteurs chimiotactiques, tels que les formyl peptides et antagonistes: FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phé);

d) hormones peptidiques tels que

35 α-MSH: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂

C) Métabolites naturels tels que:

- la biotine,

- le tétrahydrofolate,

- l'acide folique,
- la carnitine.

Dans les complexes de l'invention, l'acide nucléique peut être choisi parmi:

- 5 a) des gènes marqueurs, tels que
 - gènes contenant la luciférase,
 - gènes contenant la β -galactosidase,
 - gènes contenant la chloramphénicol acétyl transférase,
 - gènes conférant la résistance à un antibiotique, tel que
- 10 l'hygromycine ou la néomycine;
- b) des gènes à visée thérapeutique, tels que
 - récepteurs des lipoprotéines de faible densité, déficient dans les cas
 - d'hypercholestérolémie (foie),
 - facteurs de coagulation: facteurs VIII et IX,
 - 15 - phénylalanine-hydroxylase (phénylcétonurie),
 - adénosine désaminase (immunodéficiencia ADA),
 - enzymes lysosomiques, tels que la β -glucosidase dans le cas de la
 - maladie de Gaucher,
 - dystrophine et minidistrophine (myopathie),
 - 20 - tyrosine hydroxylase (Parkinson),
 - facteurs de croissance des neurones (Alzheimer),
 - CFTR cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator
 - (mucoviscidose),
 - alpha1-antitrypsine,
 - 25 - cytokines (interleukines, TNF: facteur de nécrose des tumeurs),
 - thymidine kinase du virus Herpes simplex,
 - NO synthase,
 - récepteurs de l'angiotensine II,
 - gènes suppresseurs de tumeurs, tels que le gène de la protéine p53,
 - 30 - protéines du MHC, système majeur d'histocompatibilité, en
 - particulier HLA-B7,
 - cytosine désaminase,
 - gènes codant pour des ARN sens et antisens,
 - gènes codant pour des ribozymes,
 - 35 c) des gènes à visée vaccinale
 - gènes codant pour des antigènes viraux (vaccination), par exemple:
 - gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe.

Une classe avantageuse de complexes selon l'invention, comprend ceux dans lesquels:

- le polymère, notamment la polylysine présente un degré de polymérisation d'environ 100 à environ 500, de préférence 190,
- 5 - les fonctions NH_3^+ libres des motifs lysine étant substituées à 60% par des groupements gluconoyl et éventuellement par une molécule constituant un signal de reconnaissance pour 10 000 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité d'au moins 10^6 l mole^{-1} vis à vis du récepteur de la cellule que le complexe doit cibler ou éventuellement par 60
- 10 molécules de signal de reconnaissance pour 10 000 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité inférieure d'au moins 10^4 l mole^{-1} vis à vis du susdit récepteur,
- l'acide nucléique présente un poids moléculaire d'environ $6 \cdot 10^5$ à environ $25 \cdot 10^6$, et
- 15 - le rapport entre le nombre moyen de paires de base de l'acide nucléique par molécule de motif de monomère, notamment la lysine est d'environ 0,9 à environ 1,1, de préférence d'environ 0,95 à environ 1,05.

L'invention concerne également un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un

20 polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de
- 25 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,
- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:
 - ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 - 30 → ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un
- 35 récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

Ce conjugué polymérique est un composant intermédiaire des complexes décrits précédemment.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives, par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve

que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

L'invention concerne également un conjugué polymérique chargé positivement, contenant des motifs portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70% par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

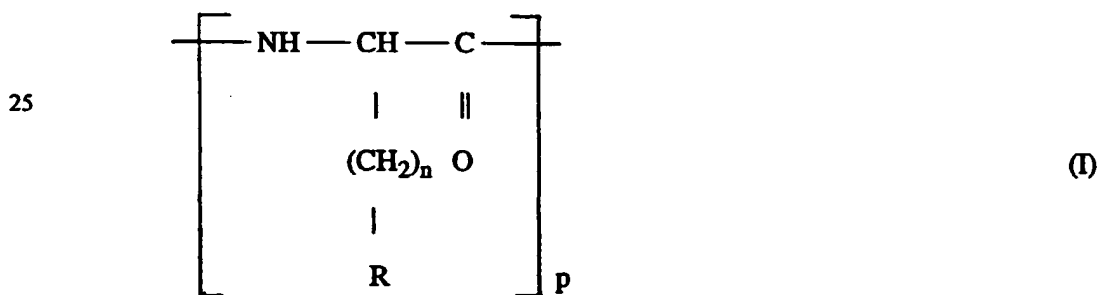
→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance de cellules,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000,

et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance peut l'être à raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

Une classe avantageuse de conjugués polymériques de l'invention contient un groupement polymérique de formule suivante:



dans laquelle:

. p est un nombre entier variant de 2 à 500 de préférence de 150 à 200

n est un nombre entier variant de 1 à 5 et vaut de préférence 4,

. ce groupement polymérique contenant un nombre de p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment

un reste dihydroxypropionyle, érythrononyle, thréonyle, ribonyle, arabinyle, xylonyle, lyxonyle, gluconyle, galactonyle, mannonyle, glycoheptonyle, glycooctonyle, m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7,

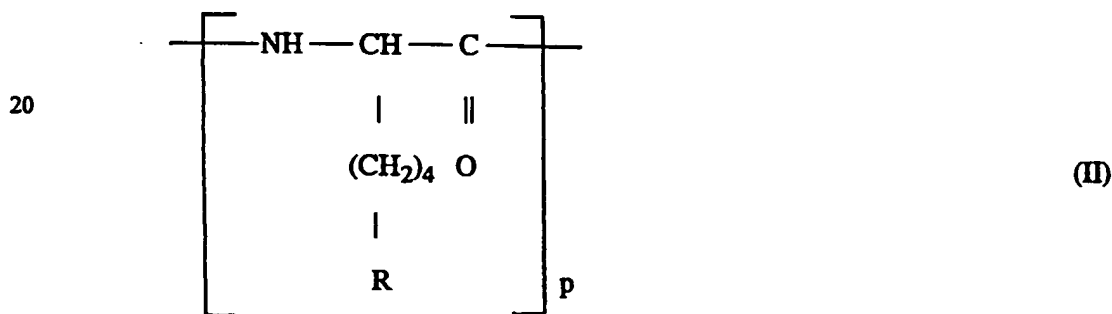
5 . R₁ représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH₃,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représente NH₃⁺,

10 * R pouvant en outre être constitué de 0 à 25% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH₃⁺ libres, et notamment à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour environ 10 000 motifs,

15 ou à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

Une autre classe avantageuse de conjugués polymériques selon l'invention contient un groupement polymérique de formule (II):



25 dans laquelle p a les significations indiquées ci-dessus,

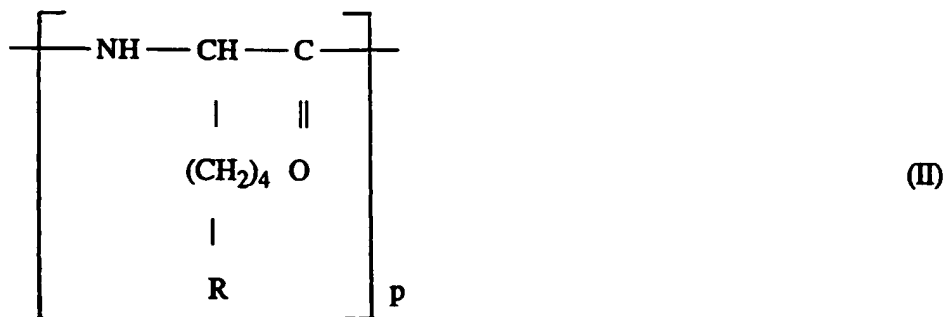
* 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe NH-CO-(CHOH)_m-R₁, m et R₁ ayant la signification indiquée à la ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH₃⁺.

30 Une autre classe avantageuse de conjugués polymériques selon l'invention contient un groupement polymérique de formule (II):

20

5



dans laquelle:

. p a la signification indiquée ci-dessus,

. ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

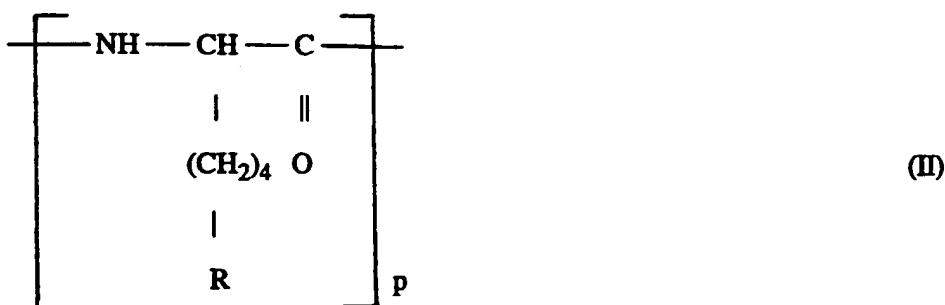
* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% des radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour 10 000 motifs.

Une autre classe avantageuse de conjugués polymériques selon l'invention contient un groupement polymérique de formule (II):

20

25



dans laquelle:

. p a la signification indiquée ci-dessus,

. ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées à la revendication 2,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% de ces radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

5 Dans les conjugués polymériques de l'invention, le signal de reconnaissance membranaire cellulaire peut être choisi parmi ceux explicités à propos des complexes décrits ci-dessus.

L'invention vise également un procédé de préparation de complexes décrits ci-dessus.

10 De façon générale, un polymère comportant des amines primaires (fonctions NH_3^+ libres) est partiellement substitué par action d'un acide organique hydroxylé (l'acide gluconique en particulier), en milieu organique.

Par exemple, un sel de polylysine (notamment sous forme de p-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique, (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et traité par un acide organique hydroxylé activé (notamment la gluconolactone).

Les signaux de reconnaissance sont fixés sur le polymère, soit avant soit après l'introduction des acides organiques hydroxylés.

20 Les signaux de reconnaissance peuvent être liés aux groupements aminés du polymère ou aux hydroxyles des acides organiques hydroxylés; ces substitutions suivent l'un quelconques des protocoles connus de l'homme de l'art.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine gluconoylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) Fixation d'osides.

Des osides simples sont sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates qui peuvent réagir dans le DMSO en présence de diisopropyléthylamine avec les fonctions ϵ -amine des résidus lysines libres de la polylysine gluconoylée comme précédemment décrit dans: Midoux et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21: 871-878.

2) Fixation d'oligosides.

Des oligosides complexes tels que les asialo-oligosides de types triantennaire ou tétraantennaire ou Lewis x sont obtenus sous forme de glycopeptides selon la méthode décrite par Nadia Normand Sdiqui, 1995, Synthèse de glycoconjugués spécifiques de lectines membranaires et leur

utilisation pour cibler oligonucléotides et gènes. (Thèse universitaire du 5 janvier 1995, Université d'Orléans).

Les glycopeptides sous forme phénylisothiocyanates sont fixés sur les fonctions ε-amine des résidus lysines libres de la polylysine gluconoylée
5 comme précédemment décrit dans: Midoux et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21: 871-878.

Le complexe acide nucléique/conjugué polymérique est obtenu en mélangeant une solution de l'acide nucléique concerné et une solution du conjugué polymérique. De préférence, lesdites solutions sont préparées à
10 partir du sérum physiologique ou d'un tampon ou d'un milieu cytocompatible.

L'invention concerne également l'utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon l'invention, pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis précédemment.

L'invention vise également l'utilisation d'un complexe ou d'un conjugué
15 selon l'invention, pour transfecter des cellules qui peuvent être choisies parmi:

- des cellules souches hématopoïétiques;

- cellules du foie;

- cellules des muscles squelettiques;

- cellules de la peau:

- 20 . fibroblastes,

- . kératinocytes,

- . cellules dendritiques,

- . mélanocytes.

- cellules des parois vasculaires;

- 25 . endothéliales;

- . musculaires lisses;

- cellules épithéliales des voies aériennes;

- cellules du système nerveux central;

- cellules cancéreuses;

- 30 - cellules du système immunitaire, telles que lymphocytes, macrophages, cellules NK etc...

Une méthode de transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de l'invention comprend la mise en présence un complexe de l'invention, dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:

- 35 - passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des cellules,

- relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans le cytosol des cellules,

- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées.

L'acide nucléique est délivré dans le cytosol et/ou dans le noyau de la cellule où il doit s'exprimer.

5 L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques, comprenant à titre de substance active, l'un au moins des complexes ou l'un au moins des conjugués selon l'invention, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10 Les complexes ou conjugués de l'invention peuvent également être partie à une trousse ou un kit, comprenant par exemple:

- un conjugué polymérique selon l'invention, par exemple, la polylysine, substituée par un résidu entraînant une diminution des charges des groupes NH_3^+ libres, ce conjugué polymérique étant apte à comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le
15 conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

- éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et le système de régulation du susdit gène,

20 - des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

- des réactifs permettant la formation d'un complexe selon l'invention entre le conjugué polymérique et le gène à transférer,

- des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.

25 Concernant le signal de reconnaissance, il faut souligner qu'il n'est pas nécessairement présent sur le conjugué polymérique. Il peut en effet être à part dans la trousse et être greffé sur le conjugué polymérique avant l'utilisation. Par ailleurs, le signal de reconnaissance peut être absent de la trousse et l'utilisateur peut, en fonction des cellules à cibler, utiliser le signal de
30 reconnaissance de son choix pour le greffer sur le conjugué polymérique de la trousse.

L'invention concerne également l'utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné, par exemple, au traitement d'une déficience métabolique congénitale ou acquise,
35 ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation d'un vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.

Les conjugués polymériques et les complexes de l'invention peuvent être utilisés pour transfecter *ex vivo* toute cellule apte à présenter un antigène, par

exemple, des précurseurs de macrophages, des macrophages, des cellules B ou des cellules dendritiques.

Lorsqu'on souhaite transfecter des macrophages, ceux-ci peuvent être préparés selon la méthode décrite par M. Chokri et coll. dans Anticancer
5 Research 12, 2257-2260, 1992.

Les complexes et conjugués polymériques de l'invention peuvent être utilisés pour transfecter des macrophages en dehors de l'organisme, lorsqu'ils sont en milieu de culture, avant ou après séparation par élutriation.

On peut utiliser une méthode analogue à celle utilisée pour la
10 transfection des cellules HepG2, mais en utilisant un oligosaccharide ciblant, par exemple le récepteur du mannose; (pour la transfection des cellules HepG2, on peut se reporter aux exemples ci-après ou à l'article de C. Sureau, J. L. Romet-Lemonne, J. Mullins et M. Essex: "Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with
15 cloned circular HBV DNA. Cell, 47, p. 37-47, 1986, ou à l'article de Midoux et al., intitulé: "Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells", Nucleic Acids Research, 1993, vol. 21, N° 4, pages 871-878).

Les macrophages transfectés "ex vivo" sont réinjectés au patient après
20 vérification de l'efficacité de la transfection selon des méthodes classiques d'immunomarquage.

L'acide nucléique dans le complexe de l'invention peut être:

- soit un gène à visée thérapeutique pour pallier une déficience métabolique congénitale ou acquise, (par exemple, facteurs de coagulation, tel
25 que le facteur VIII ou le facteur IX),
- soit un gène à visée vaccinale (par exemple, un gène codant pour une protéine exprimée à la surface d'une tumeur, ou un gène de protéine virale, bactérienne ou parasitaire).

Dans le cas d'une vaccination par réinjection de macrophages
30 transfectés, la protéine antigénique est exprimée et est en partie présente à la surface du macrophage permettant une présentation antigénique MHC type 1 dépendante.

L'acide nucléique dans le complexe de l'invention peut être également un gène conférant aux macrophages des propriétés nouvelles soit directement, soit
35 par expression de cytokines,

. cytokines ayant un effet directement sur le macrophage, lui conférant des propriétés physiologiques nouvelles;

par exemple: - transfection du gène du γ interféron; dans ce cas le macrophage est auto activé en permanence, ce qui augmente ses propriétés cytotoxiques;

5 - transfection du gène du $\text{TNF}\alpha$ modifié ou non; dans ce cas il y a augmentation des capacités anti tumorales des macrophages;

 . cytokines ayant un effet sur les populations cellulaires au voisinage des macrophages transfectés;

 par exemple: - transfection du gène de l'IL2 pour stimuler les cellules T cytotoxiques au voisinage de la tumeur colonisée par les
10 macrophages.

Description des figures

Figure 1:

15 Elle représente un fragment de polylysine gluconoylée.

Figure 1 bis:

 Elle représente un fragment de polylysine dans laquelle certaines des fonctions NH_3^+ de la polylysine sont substituées telles que $\text{R} = \text{NH}_3^+$ ou
20 $\text{NNHCO(CHOH)}_m \text{R}_1$, R_1 ayant les significations indiquées ci-dessus.

Figure 1 ter:

 Elle représente l'analyse par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,6% du plasmide pSV2Luc complexé avec des quantités variables de polylysine
25 gluconoylée.

 Les complexes ADN/polylysine gluconoylée sont préparés en ajoutant goutte à goutte sous mélange constant, des quantités variables (de 0 à 8 μg) de polylysine gluconoylée dans 60 μl de DMEM, à 2 μg (0,6 pmol) de plasmide pSV2Luc dans 140 μl de DMEM. Après 30 minutes à 20°C, 20 μl de chaque
30 échantillon est analysé par électrophorèse à travers un gel d'agarose à 0,6% contenant du bromure d'éthidium pour visualiser l'ADN dans un tampon Tris borate EDTA (Tris 95 mM, acide borique 89 mM et EDTA 2,5 mM), pH 8,6. pLK-GlcA/ADN = 0 (a), 15 (b), 30 (c), 60 (d), 90 (e), 120 (f), 150 (g), 180 (h), 210 (i) et 240 (j).

35

Figure 2:

 Elle représente le transfert de gène dans les cellules HepG2 en utilisant des polylysines gluconoylées (GlcA-pLK).

Les valeurs des gluconoyles sont déterminées par dosage colorimétrique.

Les complexes ADN/polymère formés entre le plasmide pSV2Luc et la polylysine substituée par différentes quantités de résidus gluconoyles (de 15 à 70%) ont été déterminés par électrophorèse en gel d'agarose. La polylysine substituée par plus de 140 résidus gluconoyles ne peut former un complexe avec le plasmide.

Les cellules HepG2 ont été incubées à 37°C pendant 4 heures en présence de 100 μ M de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide complexé avec chacun des conjugués. Le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées en mg de protéine ce qui correspond à 1,2 million de cellules HepG2, en fonction du rapport molaire GlcA/pLK et du degré de substitution de polylysine (%).

Figure 2 bis:

Elle représente le transfert de gène dans les cellules HepG2 en utilisant des polylysines gluconoylées dans les conditions identiques à celles décrites pour la figure 2.

La différence avec la figure 2 est que les valeurs des gluconoyles sont calculées à partir des résultats RMN.

Figure 2 ter:

Elle concerne la formation des complexes ADN/polylysine gluconoylée.

Elle concerne notamment l'étude de la quantité de polylysine gluconoylée complexée par molécule d'ADN (plasmide de 5 kb) en fonction du rapport molaire polylysine gluconoylée/ADN (P/ADN). Les complexes ADN/ polylysine gluconoylée sont formés dans 1 ml de DMEM entre le plasmide pSV2Luc (3 pmole) et de la polylysine gluconoylée marquée avec la fluorescéine et contenant 70 résidus gluconoyles. Les solutions sont centrifugées à grande vitesse. La quantité de polylysine gluconoylée complexée par molécule d'ADN (colonnes blanches) est la quantité totale de polylysine gluconoylée (déterminée en mesurant l'absorbance à 495 nm des solutions avant centrifugation (colonne hachurée) moins la quantité de polylysine gluconoylée libre (déterminée en mesurant l'absorbance à 495 nm des surnageants après centrifugation: colonne noire).

Figure 2 quater:

Elle concerne la formation des complexes ADN/polylysine gluconoylée en fonction du nombre de résidus gluconoyles fixés sur la polylysine.

Les complexes ADN/polylysine gluconoylée sont formés dans 0,2 ml de
5 DMEM entre le plasmide pSV2Luc (0,6 pmole) et des polylysines
gluconoylées contenant jusqu'à 110 résidus gluconoyles. Le rapport
 NH_3^+ /nucléotide représente le nombre de charges positives par polylysine
gluconoylée multiplié par le nombre de polylysine gluconoylée par ADN
divisé par le nombre de charges négatives portées par l'ADN dans les
10 complexes formés avec le plus petit rapport molaire polylysine
gluconoylée/ADN induisant un retard complet de l'ADN en électrophorèse en
gel d'agarose. En insert: on a représenté la variation de la quantité de
polylysine gluconoylée par molécule d'ADN dans les complexes formés avec
le plus petit rapport polylysine gluconoylée/ADN induisant un retard complet
15 de l'ADN en électrophorèse en gel d'agarose. P/ADN est la quantité de
polylysine gluconoylée par molécule d'ADN; GlcA/pLK est le nombre moyen
de résidus gluconoyles par molécule de polylysine.

Figure 3:

20 Elle représente le transfert de gène dans les cellules HepG2 en utilisant
des polylysines gluconoylées (GlcA-pLK)

Les complexes ADN/polymère formés entre le plasmide pSV2Luc et la
polylysine substituée par différentes quantités de résidus gluconoyles (de 15 à
70%) ont été déterminés par électrophorèse en gel d'agarose. La polylysine
25 substituée par plus de 140 résidus gluconoyles ne peut former un complexe
avec le plasmide. Les cellules HepG2 ont été incubées à 37°C pendant 4
heures en présence de 100 μM de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide
complexé avec chacun des conjugués. Le milieu a été éliminé et les cellules
ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du
30 gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant
l'activité de la luciférase dans des lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la
lumière émise (RLU) ont été exprimées par rapport à celle obtenue dans la
même expérience lors de la transfection des cellules HepG2 avec le conjugué
polylysine lactosylé (Lact₆₀pLK). En ordonnés, on a représenté les valeurs
35 RLU/RLU de Lact₆₀pLK, en fonction du rapport molaire GlcA/pLK d'une
part, et de degré de substitution de polylysine (%).

Figure 3 bis:

Elle concerne l'influence du nombre de résidus lactose.

L'activité optimale d'un conjugué polymérique (polymère substitué par des lactoses) apparaît lorsque 30% des groupes NH_3^+ sont substitués par du lactose.

Figure 4:

Elle concerne le transfert de gène dans différentes cellules en utilisant la polylysine gluconoylée (GlcA-pLK)

Un complexe ADN/polymère a été formé entre le plasmide pSV2Luc et la polylysine substituée par 120 résidus gluconoyles. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 4 heures en présence de 100 μM de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide complexé avec la polylysine gluconoylée.

Le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par mg de protéine. MacroH = macrophages humains dérivés de monocytes; RBE4 = cellules endothéliales de cerveau de rat; HEL = cellules leucémiques de la lignée érythroïde.

Figure 5:

Elle représente le transfert de gène dans différentes cellules en utilisant la polylysine gluconoylée (GlcA-pLK)

Un complexe ADN/polymère a été formé entre le plasmide CMVLuc et la polylysine substituée par 120 résidus gluconoyles. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 4 heures en présence de 100 μM de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide complexé avec la polylysine gluconoylée. Le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par mg de protéine. 3LL = cellules (souris) du carcinome pulmonaire de Lewis; MacroH = macrophages humains dérivés de monocytes; RBE4 = cellules endothéliales de cerveau de rat; HepG2 = hépatocarcinome humain; HEL = cellules leucémiques de la lignée érythroïde; K562 = cellules leucémiques de la lignée érythroïde.

Figure 6:

Elle concerne la mesure de la dissociation des complexes formés entre le plasmide pSV2Luc et la polylysine (degré de polymérisation = 190) substituée par des lactoses.

5 Des complexes ont été formés entre le plasmide pSV2Luc avec soit la polylysine (pLK), soit la polylysine substituée par 60 résidus de lactose (Lact₆₀pLK), soit la polylysine substituée par 80 résidus de lactose (Lact₈₀pLK). Les complexes ont été formés dans une solution de NaCl 0.15 M. la concentration de NaCl a été ensuite augmentée. Les solutions de
10 complexes ADN/polymère à différentes concentrations en NaCl ont été filtrées au travers d'une membrane de nitrocellulose 0.45 μ m. dans cette expérience, l'ADN non complexé à la polylysine passe au travers du filtre alors que l'ADN complexé est retenu sur le filtre. La quantité d'ADN dissociée de la polylysine a été déterminée en mesurant la quantité d'ADN présent dans les
15 filtrats en utilisant le DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole), (λ_{em} = 450 nm; λ_{exc} = 360 nm) (Sigma)) comme sonde fluorescente. On a porté en ordonnés le pourcentage d'ADN lié/ADN libre, en fonction de la concentration en NaCl (M). La courbe comportant des O correspond à pLK, celle comportant des • correspond à pLK,-Lact₆₀ et celle des ∇ correspond à pLK,-Lact₈₀.

20

Figure 7:

Elle concerne la mesure de la solubilité des complexes.

Des complexes ADN/polymère ont été formés dans une solution de NaCl 0.15 M entre le plasmide pSV2Luc avec soit la polylysine (pLK), la polylysine
25 gluconoylée (GlcA₁₂₀pLK) ou la polylysine substituée par 60 résidus de lactose (Lact₆₀pLK). Après 30 minutes à 20°C, l'absorbance à 610 nm des solutions a été mesurée.

Figure 7 bis:

30 Elle concerne la mesure de la solubilité des complexes.

Des complexes ADN/polymère ont été formés dans une solution de NaCl 0,15 M entre le plasmide pSV2Luc avec soit la polylysine substituée par 30 résidus de lactose (pLK, -Lact₃₀) (courbe déterminée par les carrés vides), ou la polylysine substituée par 30 résidus lactose et substituée par 50 résidus de
35 gluconoyle (pLK, -Lact₃₀, GlcA₅₀) (courbe déterminée par les triangles noirs). Après 30 minutes à 20°C, l'absorbance à 610 nm des solutions a été mesurée.

Figure 8:

Elle concerne le transfert de gène dans une lignée myéloïde.

Les cellules myéloïdes HEL sont transfectées par un complexe réalisé entre un plasmide contenant le gène de la luciférase (PUT650) et la polylysine gluconoylée et biotinylée. Ce complexe est ensuite associé au facteur de croissance des cellules souches (Stem Cell Factor, SCF) par l'intermédiaire de la streptavidine. Les valeurs des histogrammes RLU sont exprimées en unité relative de luminescence par mg de protéines extraites. Les transfections sont réalisées avec (A) le plasmide seul, (B) le plasmide complexé à la polylysine gluconoylée et biotinylée, (C) le complexe (plasmide/polylysine gluconoylée et biotinylée) associé à la streptavidine et (D) le complexe (plasmide/polylysine gluconoylée et biotinylée) associé à la streptavidine et au facteur de croissance des cellules souches.

Figure 9:

Elle concerne le spectre RMN à 300 MHz dans D₂O de la polylysine sous forme p-toluène sulfonate.

- 1,28 à 1,88 ppm: 6 H des carbones 3, 4 et 5 de la lysine
- 2,41 ppm: groupe CH₃ du p-toluène sulfonate
- 2,84 à 2,95 ppm: 2 H du carbone 6
- 4,3 ppm: 1 H du carbone 2
- 7,38 et 7,7 ppm: protons aromatiques du p-toluène sulfonate

Figure 10:

Elle concerne le spectre RMN à 300 MHz dans D₂O de la polylysine substituée par 73 résidus gluconoylé.

- 1,28 à 1,88 ppm: 6 H des carbones 3, 4 et 5 de la lysine
- 2,41 ppm: groupe CH₃ du p-toluène sulfonate
- 2,75 ppm: trace de DMSO
- 2,97 ppm: 2 H du carbone 6 d'un résidu lysine non gluconoylé
- 3,26 ppm: 2 H du carbone 6 d'un résidu lysine gluconoylé
- 3,68 à 3,88 ppm: 4 H d'un résidu gluconoylé (voir spectre n° 1,856B dans: The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FTNMR Spectra EdI C.J. Pouchert and J. Behnke, Vol. 1)
- 4,3 ppm: 1 H du carbone 8 d'un résidu gluconoylé et 1H du carbone 2 d'un résidu lysine

Tableau 1. Transfection des cellules HepG2 par la polylysine lactosylée et gluconoylée.

	RLU x 10 ⁻³ /mg de protéine	5.2	19	671	650
5	Lact/pLK	0	30	30	60
	GlcA/pLK	0	0	30	0

Les cellules HepG2 ont été incubées à 37°C en présence de 100 µM de chloroquine et 1.5 nM de plasmide complexé avec chacun des conjugués. Après 4 heures, le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par mg de protéine ce qui correspond à 1,2 million de cellules HepG2. Lact/pLK est le nombre de molécules de lactose par molécule de polylysine et GlcA/pLK est le nombre de molécules de gluconoyl par molécule de polylysine.

Tableau II. Transfection des cellules HepG2 par la polylysine gluconoylée et biotinylée.

20		RLU x 10 ⁻³ /mg de protéine
	ADN/GlcA, Bio-pLK/Strep/Bio-LactBSA	966
	ADN/GlcA, Bio-pLK/Strep/Bio-BSA	248
	ADN/GlcA, Bio-pLK/Strep	237
25	ADN/GlcA, Bio-pLK	67
	ADN	0.2

Les cellules HepG2 ont été incubées à 37°C en présence de 100 µM de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide libre ou complexé avec chacun des conjugués. Après 4 heures, le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par mg de protéine ce qui correspond à 1,2 million de cellules HepG2. GlcA, Bio-pLK = polylysine substituée par 60 gluconoyles et 2.5 biotines; Strep = streptavidine; Bio-LactBSA = sérum albumine lactosylée et biotinylée; Bio-BSA = sérum albumine biotinylée.

Composants chimiques

La luciférine, la chloroquine, le Triton X 100 et l'acide bicinchoninique proviennent de Sigma (St. Louis, MO USA); la L-glutamine, le diméthylsulfoxyde (Me₂SO), l'ATP, le glycérol et MgCl₂ proviennent de Merck (Darmstadt, Allemagne); le dithiothréitol et le D-gluconolactone proviennent de Serva (Heidelberg, Allemagne); la diisopropyléthylamine, l'acide p-toluène sulfonique, l'EDTA proviennent de Aldrich (Strasbourg, France); Dowex 2 x 8, (0,3-0,9 mm de diamètre) provient de Bio-Rad (Richmond, CA); le 4-isothiocyanatophényl-β-D-lactoside, le 4-isothiocyanatophényl-β-D-galactopyranoside sont préparés comme décrit précédemment (Monsigny, M., Roche, A.C. et Midoux, P. (1984), Uptake of neoglycoproteins via membrane lectin(s) of L 1210 cells evidenced by quantitative flow cytometry and drug targeting. Biol., Cell., 51, 187-196); la poly-L-lysine, HBr (30 000-50 000) (poids moléculaire moyen = 40 000, degré de polymérisation = 190) provient de Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Suisse). La poly-L-lysine, HBr (1 g dans 200 ml de H₂O) est passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, sous forme OH⁻, 0,3-0,9 mm de diamètre, 35 x 2.5 cm) de façon à enlever le bromure (Derrien, D., Midoux, P., Petit, C., Negre, E., Mayer, R., Monsigny, M. et Roche, A.C. (1989), Muramyl dipeptide bound to poly-L-lysine substituted with mannose and gluconoyl residues as macrophage activators. Glycoconjugate, J., 6, 241-255) qui est très cytotoxique pour les cellules (Weiss, S.J., Test, S.T., Eckmann, C.M., Roos, D. et Regiani, S. (1986), Brominating oxidants generated by human eosinophils., Science, 234, 200-202). La solution effluente est neutralisée avec 10% d'acide p-toluène sulfonique dans l'eau (un composé non cytotoxique) et lyophilisée. La sérum albumine bovine lactosylée (Lact-BSA, comportant un nombre moyen de 39 résidus de lactose) est préparée comme décrit précédemment (Roche, A.C., Barzilay, M., Midoux, P., Junqua, S., Sharon, N. and Monsigny, M., (1983), Sugar-specific endocytosis of glycoproteins by lewis lung carcinoma cells. J., Cell. Biochem., 22, 131-140; Monsigny, M., Roche, A.C. et Midoux, P. (1984), Uptake of neoglycoproteins via membrane lectin(s) of L 1210 cells evidenced by quantitative flow cytometry and drug targeting. Biol., Cell., 51, 187-196).

35

Préparation de la polylysine gluconoylée

La poly-L-lysine sous forme hydromide, pLK,HBr 30 000 - 50 000 (masse moléculaire moyenne = 40 000; degré de polymérisation moyen =

190) provient de Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Suisse). La polylysine, HBr (1 g dans 200 ml H₂O) est passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, forme OH⁻; 35 x 2,5 cm) dans le but d'enlever le brome qui est toxique pour les cellules. La solution de polylysine est neutralisée avec une solution d'acide p-toluène sulfonique à 10% dans l'eau puis lyophilisée.

La polylysine est partiellement substituée avec des résidus gluconoyles (GlcA) comme suit: la polylysine sous forme p-toluène sulfonate (50 mg; 0.86 μ moles) dissoute dans 3 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde) en présence de diisopropyléthylamine (37 μ l; 205 μ moles) et 1% d'eau, est mise à réagir pendant 24 h à 20°C avec des quantités variables de D-gluconolactone allant de 11 mg (61 μ mol) à 35 mg (194 μ mol). La polylysine gluconoylée est précipitée en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 min), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau bidistillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de résidus gluconoylé fixé par molécule de la polylysine est déterminé en mesurant le nombre moyen de résidus ϵ -NH₂ lysine libre restant sur la polylysine en utilisant le dosage colorimétrique à l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique TNBS (Fields, R. (1971) The measurement of amino groups in proteins and peptides. Biochem., J., 124, 581-590). Le poids moléculaire moyen est de 58 000.

Préparation de conjugués de polylysine lactosylée et gluconoylée.

Les polylysines substituées soit avec 30 résidus de lactose (Lact₃₀pLK) soit avec 60 résidus de lactose (Lact₆₀pLK) ont été préparées comme précédemment décrit (Midoux, P., Mendes, C., Legrand, A., Raimond, J., Mayer, R., Monsigny, M., & Roche, A.C. (1993), Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. Nucleic Acids, Res., 21, 871-878). La polylysine lactosylée contenant 30 résidus de lactose (50 mg; 0.745 μ mol) est mise à réagir pendant 24h à 20°C avec la D-gluconolactone (7,6 mg; 43 μ mol) en présence de diisopropyléthylamine (24 μ l; 200 μ mol) et 1% de H₂O. Le polymère Lact₃₀-GlcA-pLK est précipité et purifié comme décrit précédemment. Le nombre moyen de résidus gluconoyles liés par molécule de conjugué est déterminé en mesurant les groupes α -amino de la lysine restant sur la polylysine en utilisant la méthode colorimétrique TNBS (Fields, R. (1971) The measurement of amino groups in proteins and peptides, Biochem., J., 124, 581-590) est trouvé égal à 30.

Biotinylation de la polylysine et de la polylysine gluconoylée.

La polylysine gluconoylée (contenant 60 résidus gluconoyles) est substituée par de la biotine: le polymère (20 mg; 0.33 μ mol) dissous dans 0.5 ml de tampon carbonate/bicarbonate de sodium 0.1 M, pH 9.0, contenant NaCl 0.3 M, est mis à réagir pendant 20 h à 20°C avec 0.93 mg (1.7 μ mol) de sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate (NHS-LC-biotin, Pierce). Le polymère est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 min), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau bidistillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de résidu biotine fixé par molécule de polymère, déterminé en utilisant le dosage colorimétrique adapté de Green (Green, N. M. (1965), A spectrophotomatic assay for avidin and biotin based on binding dyes by avidin. Biochem., J., 94, 23c-24c) en utilisant l'acide 2-(4'-hydroxyazobenzene)benzoïque (HABA) et la streptavidine, est trouvé égal à 2.5.

Préparation de néoglycoprotéines biotinylées

La BSA et la BSA lactosylée (Lact-BSA) (0.23 μ mole) dissoutes dans 5 ml de tampon de carbonate sodium 0.1 M, pH 9.0, contenant NaCl 0.3 M sont mises à réagir pendant 20 h à 20°C, avec NHS-LC-biotine (0.65 mg; 1,2 μ mol). Les conjugués sont purifiés par filtration sur gel de Trisacryl GF05 (taille de colonne 20 x 2 cm) (Sepracor, Villeneuve la Garenne, France) dans H₂O contenant 5% de n-butanol, puis lyophilisé. Les nombres moyens de résidus de biotine liés par molécule de protéine sont déterminés en utilisant une méthode colorimétrique avec HABA, adaptée de Green (Green, N. M. (1965), A spectrophotomatic assay for avidin and biotin based on binding dyes by avidin. Biochem., J., 94, 23c-24c) et sont de 1 pour BSA et 2 pour Lact-BSA. Les masses moléculaires moyennes de BSA et Lact-BSA sont 68 000 et 87 200 respectivement.

Cellules et cultures de cellules

Les lignées cellulaires HepG2 (hépatocarcinome humain, ATCC 8065 HB) qui possèdent une lectine membranaire reconnaissant les glycoprotéines se terminant par des résidus β -D-galactose (Schwartz, A.L., Fridovich, S.E., Knowles, B.B. & Lodish, H.F. (1981) Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. J., Bio., Chem., 256, 8878-8881), les cellules HEL (ATCC TIB 180) et K-562 (ATCC CCL 243) sont cultivées respectivement en milieu DMEM (GIBCO, Reufrewshire,

U.K.) et en milieu RPMI 1640 plus 10% de sérum bovin foetal (GIBCO) désactivé par la chaleur, plus 2 mM de L-glutamine (Merck), plus des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) (Eurobio., Paris, France). Les macrophages humains dérivant de monocytes du sang sont préparés comme décrit dans Roche et al., 1985 (Roche, A.C., Midoux, P., Bouchard, P. and Monsigny, M. (1985) Membrane lectins on human monocytes: maturation-dependent modulation of 6-phosphomannose and mannose receptors. FEBS Letters, 193, 63-68). Les cellules 3LL sont cultivées comme décrit dans Roche et al., 1983 (Roche, A.C., Barzilay, M., Midoux, P., Junqua, S., Sharon, N. and Monsigny, M. (1983) Sugar-specific endocytosis of glycoproteins by lewis lung carcinoma cells. J., Cell., Biochem., 22, 131-140). Les cellules RBE4, données par P.O. Couraud (Hôpital Cochin, Paris) sont cultivées sur collagène dans un milieu α -MEM et HamF₁₀ (50/50, volume; volume) plus 10% de sérum bovin foetal désactivé par la chaleur, plus 2 mM de L-glutamine, plus des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) en présence de TGF β .

Les plasmides

Le plasmide pSV2Luc (5.0 kb) est fourni par le Dr. A.B. Brasier (Massachusetts General Hospital, Boston) (Brasier, A.R., Tate, J.E. & Habener, J.F. (1989) Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. Biotechniques, 7, 1116-1123). Le plasmide CMVLuc est fourni par le Dr. A. Dautry-Varsat (Institut Pasteur, Paris).

Formation de complexes plasmide/conjugué de polylysine optimaux.

Seuls les complexes pour lesquels aucune migration de l'ADN se produit en électrophorèse sur un gel d'agarose, et ainsi appelés complexes d'ADN/polymère optimaux sont utilisés pour transfecter les cellules. Les rapports molaires entre le polymère et l'ADN nécessaires pour former des complexes plasmide pSV2Luc/polymère optimaux sont déterminés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.6%: les complexes sont préparés en ajoutant goutte à goutte sous mélange constant, des quantités variables de conjugués de polylysine dans 60 µl de DMEM, à 2µg (0.6pmol) de plasmide pSV2Luc dans 140 µl de DMEM. Après incubation pendant 30 minutes à 20°C, 20 µl de chaque échantillon est analysé par électrophorèse à travers un gel d'agarose à 0.6% contenant du bromure d'éthidium pour visualiser l'ADN

dans un tampon Tris borate EDTA (Tris 95 mM, acide borique 89 mM et EDTA 2.5 mM), pH 8.6.

Préparation des complexes ADN/vecteurs.

5 *Complexes plasmide pSV2Luc/conjugué de polylysine.*

Des complexes ADN/polymère optimaux sont préparés en ajoutant goutte à goutte sous agitation constante la polylysine ou un conjugué de poly-L-lysine (Lact₆₀pLK, GlcA_x-pLK, $30 \leq x \leq 130$, avec Lact₃₀pLK, ou Lact₃₀-GlcA₃₀-pLK) dans 0.6 ml de DMEM à 20 µg (6 pmol) de plasmide pSV2Luc dans 1.4 ml de DMEM. La solution est maintenue pendant 10 30 minutes à 20°C.

Complexes de plasmide pSV2Luc/pLK-streptavidine-néoglycoprotéine.

Les complexes de plasmide pSV2Luc/polylysine biotinylée optimaux, sont formés en ajoutant goutte à goutte sous mélange constant 10 µg (172 15 pmol) de polylysine gluconoylée et biotinylée (contenant 60 résidus gluconoyles) dans 290 µl de DMEM à 10 µg (3 pmol) de plasmide pSV2Luc dans 0.7 ml de DMEM (rapport molaire entre le polymère et l'ADN proche de 57:1). La solution est maintenue pendant 30 minutes à 20°C. Ensuite les néoglycoprotéines biotinylées (Lact-BSA et BSA) (377 pmol) dans 0.5 ml de 20 DMEM sont ajoutées avec agitation constante à 1 ml de complexe plasmide pSV2Luc/polylysine biotinylée, et puis la streptavidine (27.5 µg; 490 pmol) dans 0.5 ml de DMEM est ajoutée sous agitation (rapport molaire entre la néoglycoprotéine et l'ADN voisin de 125:1) et la solution est maintenue pendant 30 minutes à 20°C.

25

Transfert de gène

5 x 10⁵ cellules HepG2 par puits sont déposées au jour 0 sur des plaques de culture de tissus de 12 puits, respectivement. Au jour 1, après avoir retiré le milieu, la solution (2 ml) contenant le complexe plasmide/conjugué de 30 polylysine supplémenté avec 1% de sérum bovin foetal inactivé par la chaleur, et porté à une valeur de concentration de 100 µM dans la chloroquine (Luthman, H & Magnusson, G. (1983) High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308), est ajoutée dans le puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C, le surnageant 35 est retiré et 2 ml de milieu DMEM frais complet sont ajoutés et les cellules sont ensuite incubées pendant 48 h à 37°C.

Test à la luciférase

L'expression génétique de la luciférase est mesurée par luminescence selon la méthode décrite par De Wet et al., 1987, (De Wet, J.R., Wood, K.V., De Luca, M., Helinski, D.R. & Subramani, S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol., Cell., Biol.*, 7, 725-737). Le milieu de culture est retiré, et les cellules sont récoltées après incubation à 37°C dans du PBS contenant 0.2 mg/ml de EDTA et 2.5 µg/ml de trypsine (GIBCO) et lavées 3 fois avec du PBS. Le tampon d'homogénéisation (200 µl; 8 mM MgCl₂, 1 mM de dithiothréitol, 1 mM d'EDTA, 1% de Triton X 100 et 15% de glycérol, 25 mM de tampon Tris-phosphate pH 7.8), est ajouté au culot. La suspension est agitée par un vortex et conservée pendant 10 min à 20°C. La solution est envoyée en bas du tube par centrifugation (5 min 800 g). L'ATP (95 µl d'une solution 2 mM dans le tampon d'homogénéisation sans Triton X 100) est ajouté à 60 µl du surnageant et la luminescence est enregistrée pendant 4 secondes en utilisant un luminomètre (Lumat LB 9501, Berthold, Wildbach, Allemagne) sur addition automatique de 150 µl de luciférine 167 µM dans l'eau; les mesures sont faites en triple.

Dosage de protéine

Un dosage de protéine est effectué pour chaque échantillon en utilisant la méthode colorimétrique d'acide bicinchoninique (BCA) (Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal., Biochem.*, 150, 76-85), adaptée par Hill et Straka (1988) (Hill, H.D. & Straka, J.G. (1988) Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulphydryl reagents. *Anal., Biochem.*, 170, 203-208) pour se débarrasser de la présence de DTT dans le tampon d'homogénéisation. La mesure de l'expression de luciférase est exprimée comme unité de lumière relative (RLU) par mg de BSA (albumine libre d'acide gras purifiée et cristallisée, A7511, Sigma), 1 mg BSA correspondant à $1,2 \times 10^6$ cellules HepG2.

Résultats

Polylysine gluconoylée

La poly-L-lysine (masse moléculaire moyenne de la forme salifiée 40.000; degré de polymérisation moyen 190) a été partiellement (de 15 à 70%)

acylée sur les fonctions ϵ -NH₂ de la lysine en utilisant la D-gluconolactone, un agent également hydrosolubilisant. Le but est de réduire le nombre de charges positives sur la polylysine et par conséquent de réduire les interactions électrostatiques entre le polymère et un plasmide.

5 En présence de polylysine, l'ADN se condense fortement par un mécanisme coopératif entre les charges positives de la polylysine et les charges négatives de l'ADN.

10 La formation des complexes entre un plasmide de 5 kb tel que le plasmide pSV2Luc contenant le gène de la luciférase avec des polylysines substituées par des quantités croissantes de résidus gluconoyles est analysée par électrophorèse en gel d'aragose et les complexes ADN/polymère optimaux correspondent à ceux pour lesquels l'ADN ne migre pas en électrophorèse par suite de la totale condensation de l'ADN, sont ainsi aisément déterminés (Figure 1 ter). Au-delà de 80% de substitution, la polylysine gluconoylée ne
15 forme plus de complexe avec l'ADN.

20 La quantité de polylysine gluconoylée complexée par molécule d'ADN en fonction du rapport (P/ADN) entre la polylysine gluconoylée et l'ADN a été déterminé (Figure 2 ter). Lorsque celui-ci est compris entre 100 et 200, la quantité de polylysine gluconoylée libre est pratiquement nulle, en d'autre terme, toute la polylysine est complexée avec l'ADN. Par conséquent, aucune purification de ces complexes n'est nécessaire et une toxicité induite par de la polylysine libre sera écartée. En outre, les complexes réalisés avec ces rapports sont des complexes qui permettent une très bonne efficacité de transfection.

25 Comme le montrent les résultats des figures 2 et 2 bis, l'expression de la luciférase par les cellules HepG2 (hépatocarcinome humain) augmente avec la quantité de résidus gluconoyles fixée sur la polylysine et atteint un maximum (environ 300 fois plus qu'avec le plasmide seul) (ligne de base) lorsque la polylysine est substituée par 45 à 70% (88 à 132 résidus) gluconoyles lorsque le dosage est colorimétrique (figure 2) ou 35 à 70% (70 à 132 résidus) gluconoyles lorsque le dosage est effectué par RMN (figure 2 bis). Les polylysines substituées par peu ou trop de résidus gluconoyles sont pas ou peu efficaces. A titre de comparaison, l'expression de la luciférase obtenue dans ces mêmes cellules et dans les mêmes conditions en utilisant la polylysine
30 lactosylée dans les conditions optimales, permet de conclure que la transfection obtenue avec la polylysine gluconoylée (substituée à 58%) est comparable à celle obtenue avec la polylysine lactosylée dans les conditions optimales.
35

Dans les complexes ADN/polymères pour lesquels l'ADN ne migre pas en électrophorèse par suite de la totale condensation de l'ADN, le rapport molaire entre la quantité de polylysine gluconoylée et l'ADN augmente et le rapport entre le nombre de charges positives et le nombre de charges négatives augmente linéairement lorsque le nombre de résidus gluconoyles fixés sur la polylysine augmente (Figure 2 quater). Les complexes présentent un excès de charges négatives lorsque la polylysine est faiblement substituée et sont globalement neutres lorsque la polylysine est substituée à moitié. Dans les conditions maximales de transfection (35 à 45% de substitution), les complexes sont proches de la neutralité. Ceci indique que le caractère polycationique de la polylysine n'est pas en cause dans l'efficacité de la transfection. Le caractère neutre ou anionique des complexes ADN/polylysine gluconoylée limitant les interactions non spécifiques avec les cellules est un atout supplémentaire pour leur utilisation *in vivo*.

La polylysine substituée par 45 à 70% (88 à 132 résidus) de gluconoyles permet de préparer des complexes ADN/polymère fortement concentrés, jusqu'à 100 µg/ml d'ADN, alors qu'avec la polylysine lactosylée, il est seulement possible de préparer des complexes 10 fois moins concentrés. Dans la figure 7, est montrée, de façon comparative, la solubilité en fonction de la concentration en ADN, des complexes ADN/polylysine ADN/polylysine gluconoylée et ADN/polylysine lactosylée. Cette étude est réalisée en mesurant la turbidité (mesure de l'absorbance à 610 nm) des différentes solutions. Les complexes ADN/polylysine et ADN/polylysine gluconoylée restent solubles jusqu'à plus de 100 µg/ml, alors qu'avec la polylysine lactosylée, les complexes précipitent à partir de 20 µg/ml. En présence de polymère, l'ADN se condense fortement par suite d'un phénomène coopératif entre les charges positives et négatives des deux polymères. Dans le cas de la polylysine gluconoylée, environ 60% des charges positives étant substituées, la coopérativité des interactions électrostatiques entre l'ADN et le polymère est diminuée, ce qui facilite une dissociation des complexes ADN/polymère et en particulier un relargage de l'ADN dans la cellule et permet une bonne expression du gène. Une étude de la modification de la coopérativité des interactions électrostatiques entre l'ADN et la polylysine gluconoylée est réalisée en fonction de la force ionique et de la nature des contre ions.

Polylysine gluconoylée munie d'un signal de reconnaissance.

La polylysine gluconoylée peut être substituée par un ligand de petite masse moléculaire tel que le lactose ayant une affinité moyenne pour un

récepteur membranaire ou la biotine ayant une forte affinité pour un récepteur membranaire.

Polylysine gluconoylée et lactosylée.

5 Lorsque la polylysine est substituée par 30 résidus de lactose, les cellules HepG2 sont très faiblement transfectées comparativement aux résultats obtenus avec la polylysine substituée par 60 résidus de lactose (Tableau I). La polylysine substituée par 30 lactoses possède encore beaucoup de charges positives, interagit fortement avec l'ADN et ne permet pas une dissociation
10 rapide de l'ADN du complexe. Lorsque la polylysine contenant 30 résidus de lactose est en plus substituée par 30 résidus gluconoyles, l'expression de la luciférase est élevée et comparable à celle obtenue avec la polylysine substituée par 60 résidus de lactose. L'addition de résidus gluconoyle permet de réduire les interactions électrostatiques entre l'ADN et la polylysine,
15 facilitant une dissociation rapide de l'ADN dans la cellule.

De plus, comme le montre la figure 7 bis, la substitution de la polylysine à la fois par des résidus lactose et gluconoyle, augmente la solubilité des complexes par rapport à la polylysine uniquement lactosylée et permet de faire
20 des préparations de complexes concentrés jusqu'à 100 µg/ml utilisables *in vivo*.

Polylysine gluconoylée et biotinylée.

Lorsque la polylysine gluconoylée (contenant 60 résidus gluconoyles) est substituée par un très petit nombre (2.5) de résidus de biotine, les complexes
25 ADN/polylysine biotinylée ont une très forte affinité (10^{15} l/ mole) pour la streptavidine. Si de plus la streptavidine est munie d'un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire spécifique d'un type cellulaire qui induit l'endocytose des complexes, l'ADN acquiert alors une spécificité cellulaire. Ceci est montré dans le Tableau II: le plasmide complexé
30 par l'intermédiaire de la polylysine gluconoylée et biotinylée à de la streptavidine munie d'un signal de reconnaissance tel que la sérum albumine lactosylée reconnue et endocytée via la lectine membranaire des cellules HepG2, l'expression de la luciférase est beaucoup plus importante que lorsque la sérum albumine est dépourvue de lactose ou bien que la streptavidine est
35 dépourvue d'un signal de reconnaissance.

Transfert de gènes par des complexes ADN/cytokine.

Le transfert de gènes dans des lignées myéloïdes par des complexes avec la polylysine liée au facteur de croissance des cellules souches (Stem Cell Factor, SCF) est représenté sur la figure 8. Un plasmide contenant le gène de la luciférase a été complexé par l'intermédiaire de la polylysine gluconoylée et biotinylée au SCF biotinylé en utilisant de la streptavidine. Les complexes ainsi formés sont efficaces pour transfecter les cellules HEL qui expriment de nombreux récepteurs (c-kit) pour le SCF.

Polylysine gluconoylée et transfert de gènes dans divers types cellulaires.

La polylysine substituée par 45 à 70% de gluconoyles permet de transfecter avec une bonne efficacité, des cellules adhérentes telles que des macrophages humains, un hépatocarcinome humain, des cellules endothéliales de rat mais également des cellules non adhérentes telles qu'un lymphome T humain et des cellules leucémiques de la lignée érythroïde (Figures 4 et 5).

Conclusions

Le caractère inventif de la polylysine gluconoylée repose:

- sur l'utilisation d'une polylysine partiellement substituée pour réduire les interactions électrostatiques entre l'ADN et le polycation afin de faciliter un relargage intracellulaire de l'ADN après internalisation dans la cellule par un phénomène d'endocytose non spécifique (la présence de récepteurs membranaires capables de reconnaître spécifiquement les résidus gluconoyles, n'est pas connue);
- les résidus gluconoyles agissent également comme hydrosolubilisant et permettent de préparer des complexes ADN/polylysine très concentrés et donc une meilleure utilisation *in vivo*, ce qui n'est pas le cas avec la polylysine lactosylée ou bien la polylysine substituée par des protéines comme la transferrine ou l'asialooromucoïde;
- la polylysine gluconoylée peut être utilisée pour transfecter divers types cellulaires et en particulier des cellules non adhérentes;
- la polylysine gluconoylée peut être utilisée comme polymère de base pour conférer une spécificité cellulaire à l'ADN par addition de quelques molécules de ligands de faible masse moléculaire reconnues par des récepteurs membranaires spécifiques. L'avantage de la polylysine gluconoylée par rapport à la polylysine non gluconoylée réside dans le fait que celle-ci est déjà optimisée pour permettre la formation de complexes ADN/polymère-ligand

facilement dissociables dans la cellule ce qui réduit le nombre de molécules de ligands à fixer sur la polylysine. En effet, on a déjà montré que l'efficacité de transfection dépend du nombre de molécules de d'oses fixées sur la polylysine non gluconoylée (60 résidus lactose ou 80 résidus galactose sont nécessaires
5 pour une transfection optimale dans les cellules possédant un récepteur reconnu pour le lactose ou le galactose).

REVENDICATIONS

1. Complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, ce rapport étant déterminé par méthode colorimétrique (Fields R. (1971) Biochem. J., 124: 581-590), ou avantageusement de 35% à 70%, notamment de 40%, ce rapport étant déterminé par résonance magnétique nucléaire, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

2. Complexe selon la revendication 1, entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

3. Complexe selon la revendication 1, entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives, par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:
 - ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 - ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

4. Complexe selon l'une des revendications 1 ou 2, entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges

positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant ainsi la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance de cellules,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs étant également substituées de 0 à 40% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres, et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance peut l'être à raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

5. Complexe selon l'une des revendications 1, 2 ou 4, entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant ainsi la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

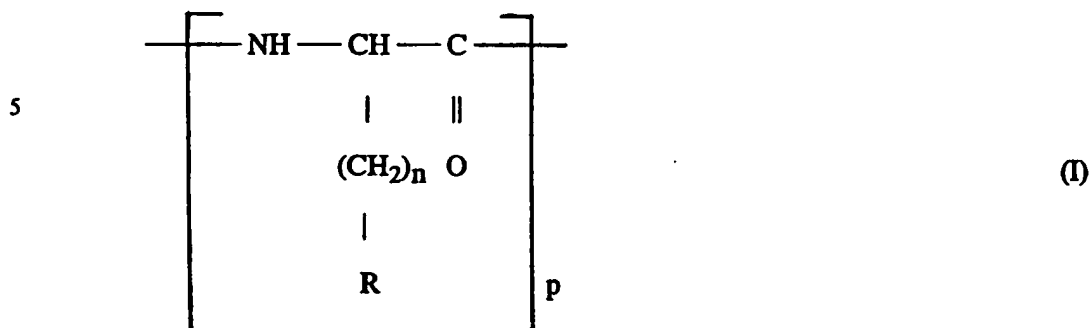
→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000,

et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance peut l'être à raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

6. Complexe selon l'une des revendications 1, 2, 4 ou 5, dans lequel le polymère contient un groupement polymérique de formule (I) suivante:



dans laquelle:

- . p est un nombre entier variant de 2 à 500 de préférence de 150 à 200,
- . n est un nombre entier variant de 1 à 5 et vaut de préférence 4,
- . ce groupement polymérique contenant un nombre de p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment un reste dihydroxypropionyle, érythrononoyale, thréonoyale, ribonoyale, arabinoyale, xylonoyale, lyxonoyale, gluconoyale, galactonoyale, mannonoyale, glycoheptonoyale, glycooctonoyale,

. m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7,

. R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 ,

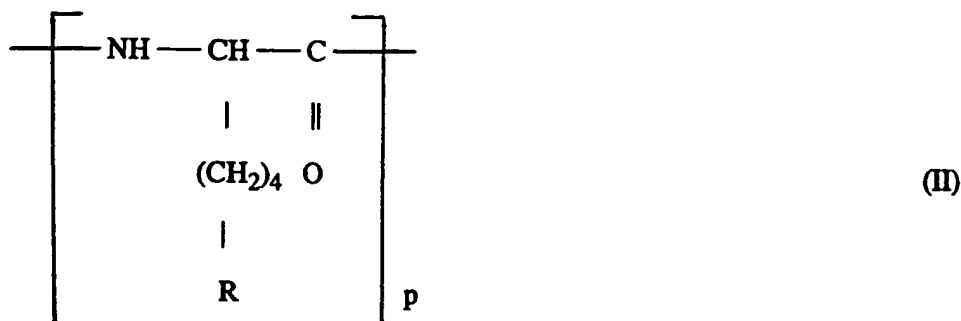
* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ ,

* R pouvant en outre être constitué de 0 à 25% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres, et notamment à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour environ 10 000 motifs,

ou à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

7. Complexe selon la revendication 6, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):

5



dans laquelle:

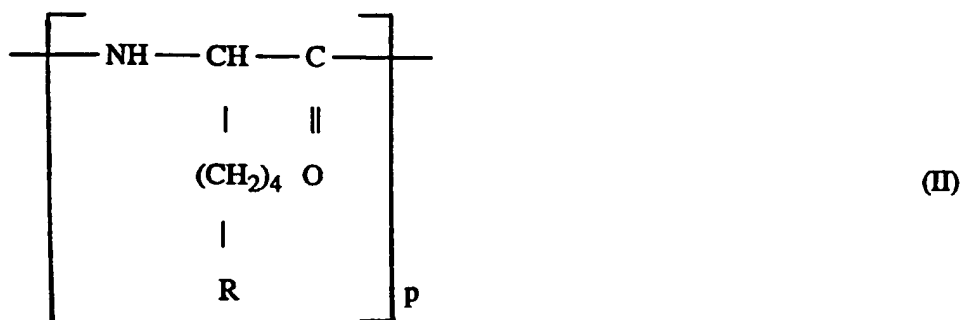
. p a les significations indiquées à la revendication 6,

10 * 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe
 $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant la signification indiquée ci-dessus,

15 * le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des
radicaux R représentent NH_3^+ , et de 0 à 25% des radicaux R pouvant être
substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu
par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué
polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

8. Complexe selon la revendication 6, dans lequel le polymère comprend
un groupement polymérique de formule (II):

20



25

dans laquelle:

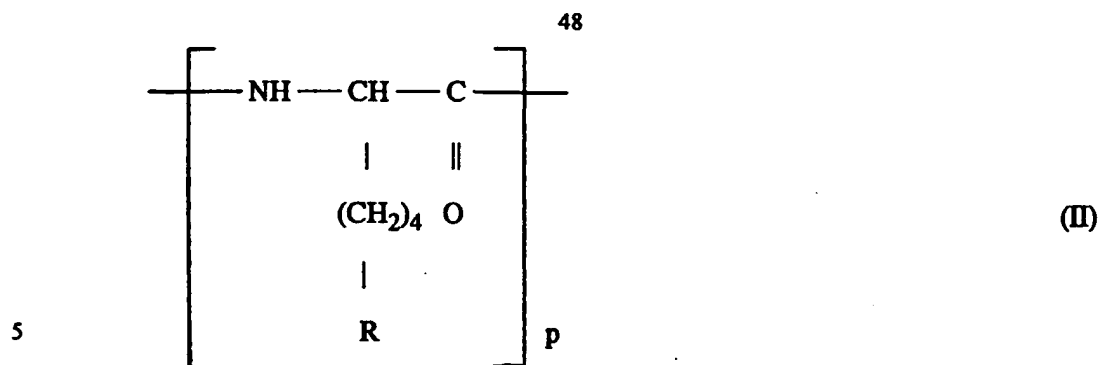
. p a les significations indiquées à la revendication 6,

30 * 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe
 $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant la signification indiquée ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des
radicaux R représentent NH_3^+ .

9. Complexe selon la revendication 6, dans lequel le polymère comprend
un groupement polymérique de formule (II):

35



dans laquelle:

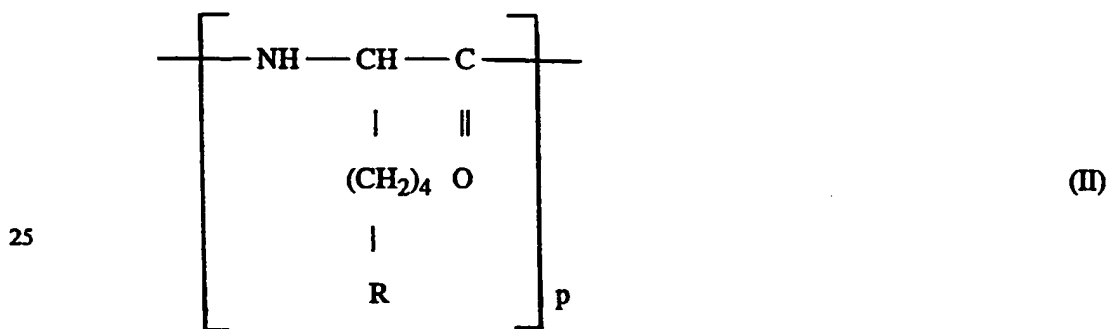
p a la signification indiquée à la revendication 6,

ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R
10 parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un
groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées à la
revendication 2,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% des
15 radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui
constitue un signal de reconnaissance à raison de 0,5 à 5, avantageusement de
1 molécule pour 10 000 motifs.

10. Complexe selon la revendication 6, dans lequel le polymère
20 comprend un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

p a la signification indiquée à la revendication 6,

ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi
30 lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un
groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées à la
revendication 2,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% de ces radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

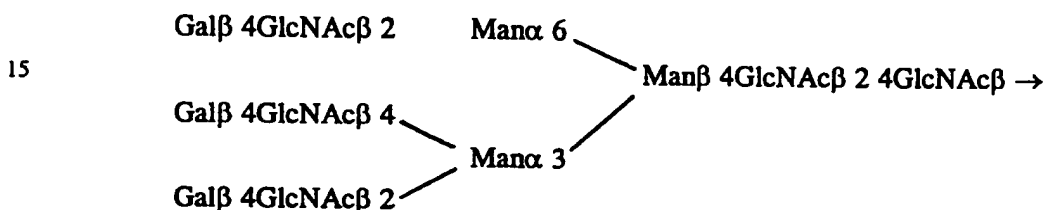
5

11. Complexe selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le signal de reconnaissance est choisi parmi:

A) - des osides simples ou complexes reconnus par des lectines membranaires, et choisis parmi:

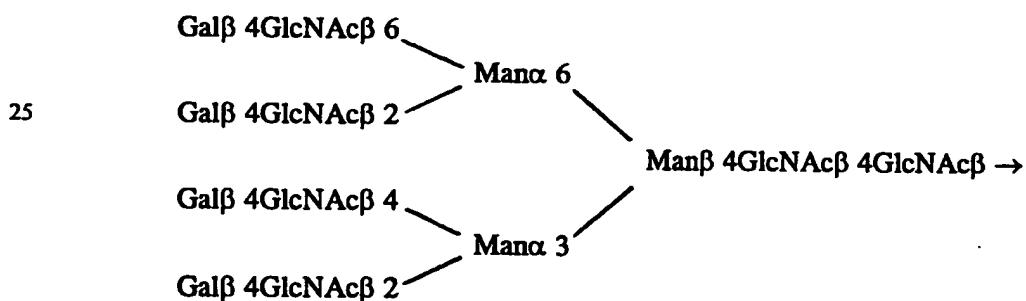
10

a. Asialo-oligoside de type triantennaire lactosamine: récepteur d'asialoglycoprotéine



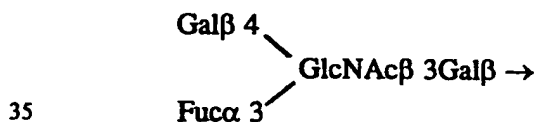
20

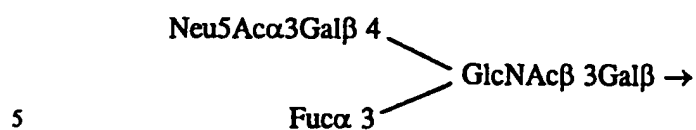
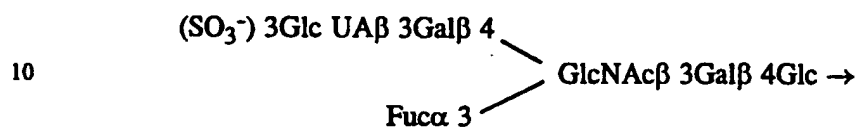
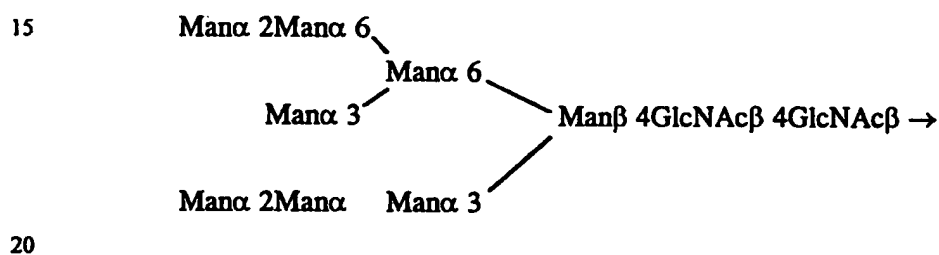
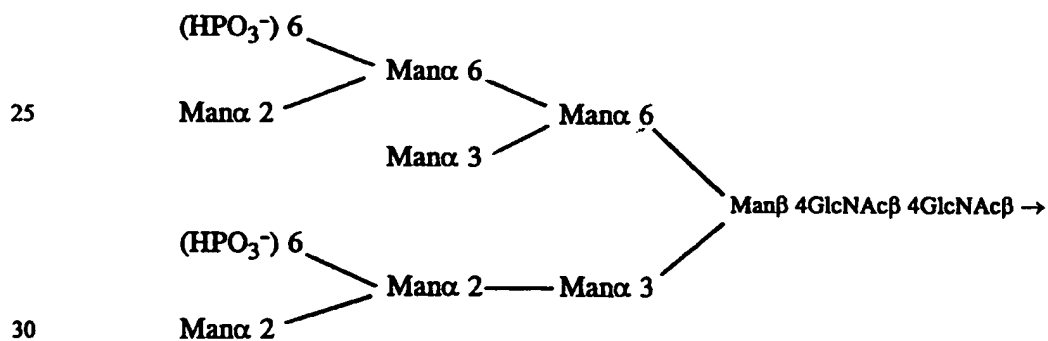
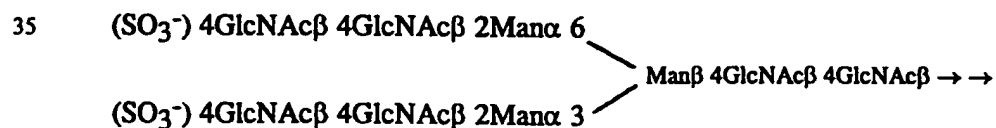
b. Asialo oligoside de type lactosamine tetraantennaire: récepteur d'asialoglycoprotéine



30

c. Lewis x: LECAM 2/3



d. Lewis x sialyl: LECAM 3/2**e. Dérivé de Lewis x sulfaté (HNK1): LECAM 1****f. Oligomannoside: récepteur du mannose****g. Oligomannoside phosphorylé: récepteur de mannose 6 phosphate****h. Oligosaccharide de type lactosamine sulfaté: récepteur de GalNAc 4 sulfaté**

B) des peptides

a) peptides anti-inflammatoires ou certains de leurs fragments reconnus par des récepteurs de la paroi vasculaire, tels que

- polypeptide vasodilatateur intestinal (VIP)

5 HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH₂

- polypeptide atrial natriurétique (ANP)

SLRRSSCFGGRMDRIGASGLGCNSFRY

- lipocortine

HDMNKVLDL

10 - bradykinine

RPPGFSPFR;

b) peptides ligands des intégrines, tels que les peptides contenant la séquence RGD tel que le récepteur de la fibronectine;

c) facteurs chimiotactiques, tels que les formyl peptides et antagonistes:

15 FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phé);

d) hormones peptidiques tels que

α -MSH: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂

C) Métabolites naturels tels que:

- la biotine,

20 - le tétrahydrofolate,

- l'acide folique,

- la carnitine.

25 12. Complexe selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'acide nucléique peut être choisi parmi:

a) des gènes marqueurs, tels que

- gènes contenant la luciférase,

- gènes contenant la β -galactosidase,

- gènes contenant la chloramphénicol acétyl transférase,

30 - gènes conférant la résistance à un antibiotique, tel que l'hygromycine et la néomycine etc...;

b) des gènes à visée thérapeutique, tels que

- récepteurs des lipoprotéines de faible densité, déficient dans les cas d'hypercholestérolémie (foie),

35 - facteurs de coagulation: facteurs VIII et IX,

- phénylalanine-hydroxylase (phénylcétonurie),

- adénosine désaminase (immunodéficience ADA),

- enzymes lysosomiques, tels que la β -glucosidase dans le cas de la maladie de Gaucher,
- dystrophine et minidistrophine (myopathie),
- tyrosine hydroxylase (Parkinson),
- 5 - facteurs de croissance des neurones (Alzheimer),
- CFTR cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator (mucoviscidose),
- α 1-antitrypsine,
- cytokines (interleukines, TNF facteur de nécrose des tumeurs),
- 10 - thymidine kinase du virus Herpes simplex,
- NO synthase,
- récepteurs de l'angiotensine II,
- gènes suppresseurs de tumeurs, tels que le gène de la protéine p53,
- protéines du MHC, système majeur d'histocompatibilité, en
- 15 particulier HLA-B7,
- cytosine désaminase,
- gènes codant pour des ARN sens et antisens,
- gènes codant pour des ribozymes,
- c) des gènes à visée vaccinale
- 20 - gènes codant pour des antigènes viraux (vaccination), par exemple: gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe.

13. Complexe selon l'une des revendications 1 à 12, dans lequel:

- le polymère, notamment la polylysine présente un degré de
- 25 polymérisation d'environ 100 à environ 500, de préférence 190,
- les fonctions NH_3^+ libres des motifs lysine étant substituées dans un rapport de 60 par des groupements gluconoylé et éventuellement par une molécule constituant un signal de reconnaissance pour 10 000 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité d'au moins 10^6 l mole^{-1} vis
- 30 à vis du récepteur de la cellule que le complexe doit cibler ou éventuellement par 60 molécules de signal de reconnaissance pour 10 000 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité inférieure d'au moins 10^4 l mole^{-1} vis à vis du susdit récepteur,
- l'acide nucléique présente un poids moléculaire d'environ $6 \cdot 10^5$ à
- 35 environ $25 \cdot 10^6$, et
- le rapport entre le nombre moyen de paires de base de l'acide nucléique par molécule de motif de monomère, notamment la lysine est d'environ 0,9 à environ 1,1, de préférence d'environ 0,95 à environ 1,05.

14. Conjugué polymérique chargé positivement, contenant des motifs portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- 5 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,
- 10 - les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:
 - ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 - ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
- 15 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

20 15. Conjugué polymérique selon la revendication 14, et tel que défini selon l'une des revendications 2 à 5, ou contenant un groupement polymérique de formule selon l'une des revendications 6 à 10.

25 16. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 13, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 14 ou 15, pour la transfection *in vitro* ou *ex vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis à la revendication 12.

30 17. Utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon la revendication 16, caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi:

- 30 - des cellules souches hématopoiétiques;
- cellules du foie;
- cellules des muscles squelettiques;
- cellules de la peau:
 - 35 . fibroblastes,
 - . kératinocytes,
 - . cellules dendritiques,
 - . mélanocytes.
- cellules des parois vasculaires;

- . endothéliales;
- . musculaires lisses;
- cellules épithéliales des voies aériennes;
- cellules du système nerveux central;
- 5 - cellules cancéreuses;
- cellules du système immunitaire, telles que des lymphocytes, des macrophages, des cellules NK etc...

10 **18. Méthode de transfection *in vitro* ou *ex vivo*, caractérisée en ce que l'on met en présence un complexe, selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:**

- passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des cellules,
- 15 - relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans le cytosol des cellules,
- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées.

20 **19. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de substance active, l'un au moins des complexes selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, ou l'un au moins des conjugués selon l'une des revendications 14 ou 15, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.**

25 **20. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 13, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 14 ou 15, pour la préparation d'un médicament destiné par exemple au traitement de déficience métabolique congénitale ou acquise, ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation**
30 **d'un vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.**

21. Trousse ou kit comprenant:

- un conjugué polymérique selon l'une des revendications 14 ou 15, tel que la polylysine, substituée par un résidu entraînant une diminution des charges des groupes NH_3^+ libres, ce conjugué polymérique étant apte à
35 comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le susdit conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

- éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et le système de régulation du susdit gène,

- des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

5 - des réactifs permettant la formation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 13, entre le conjugué polymérique et le gène à transférer,

- des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.

1/17

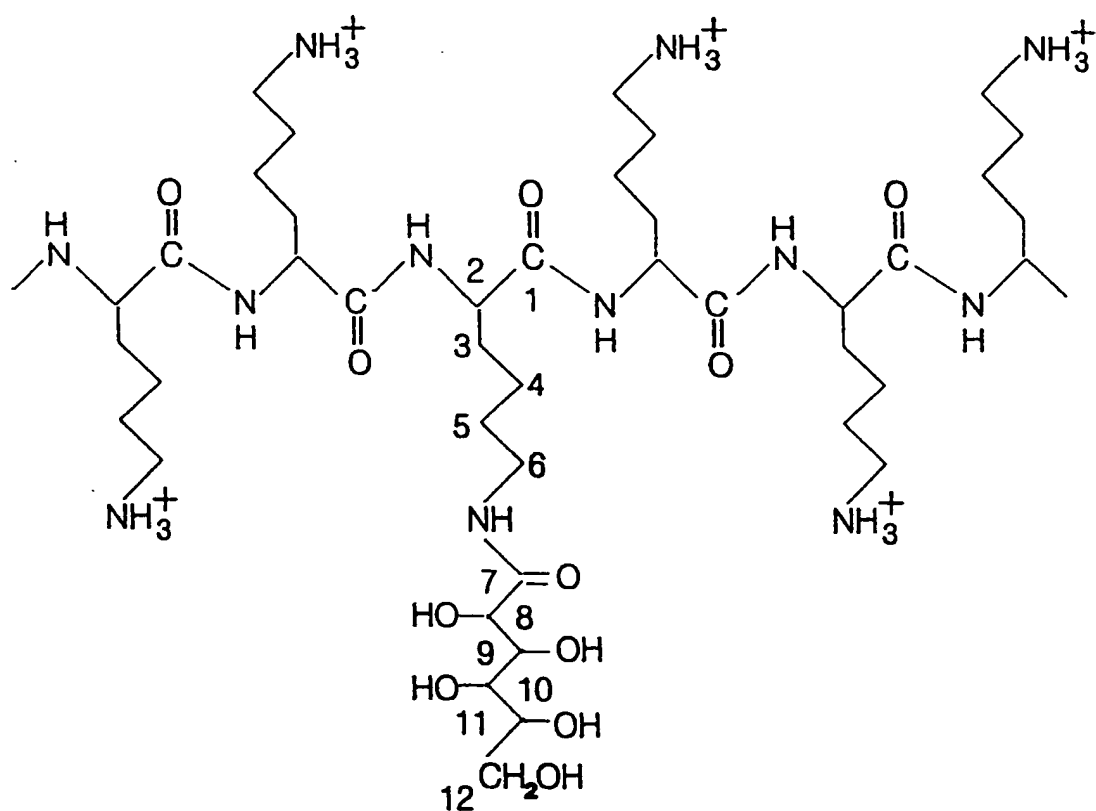


Figure 1a

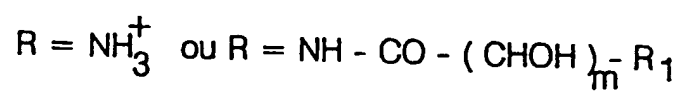
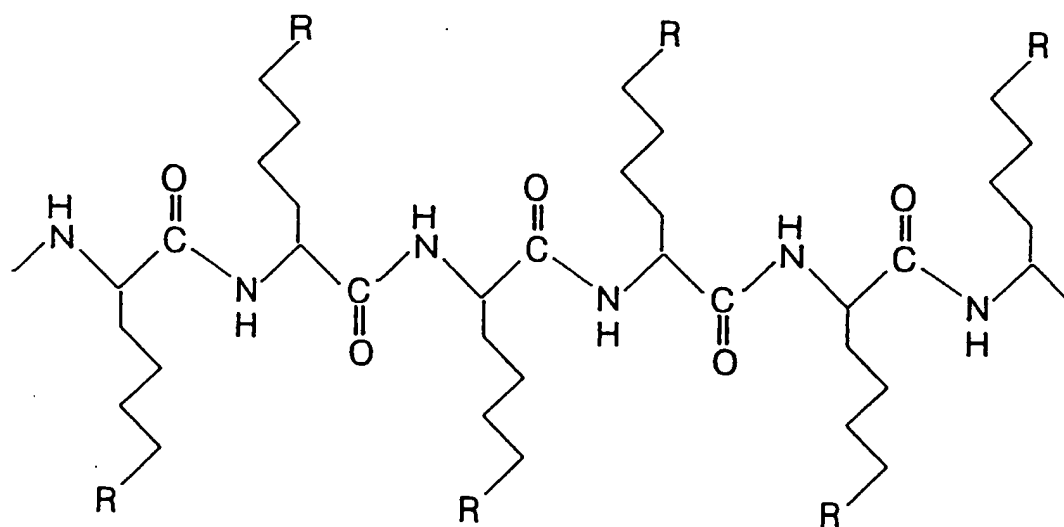


Figure 1b

3/17

a b c d e f g h i j

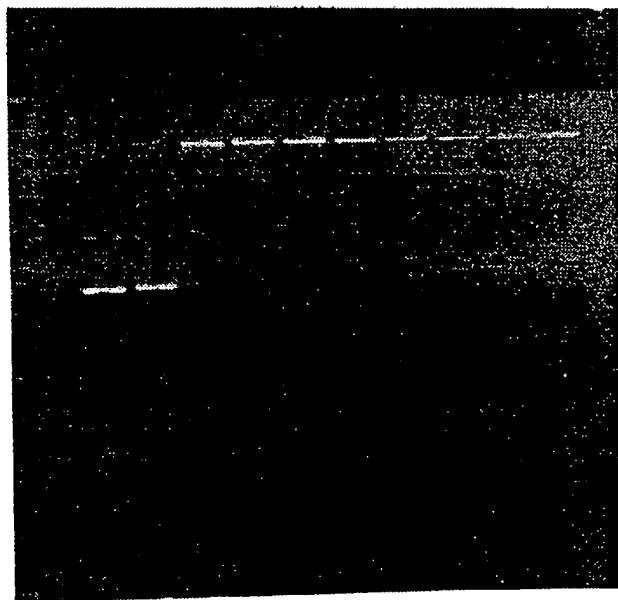


Figure 1c

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4/17

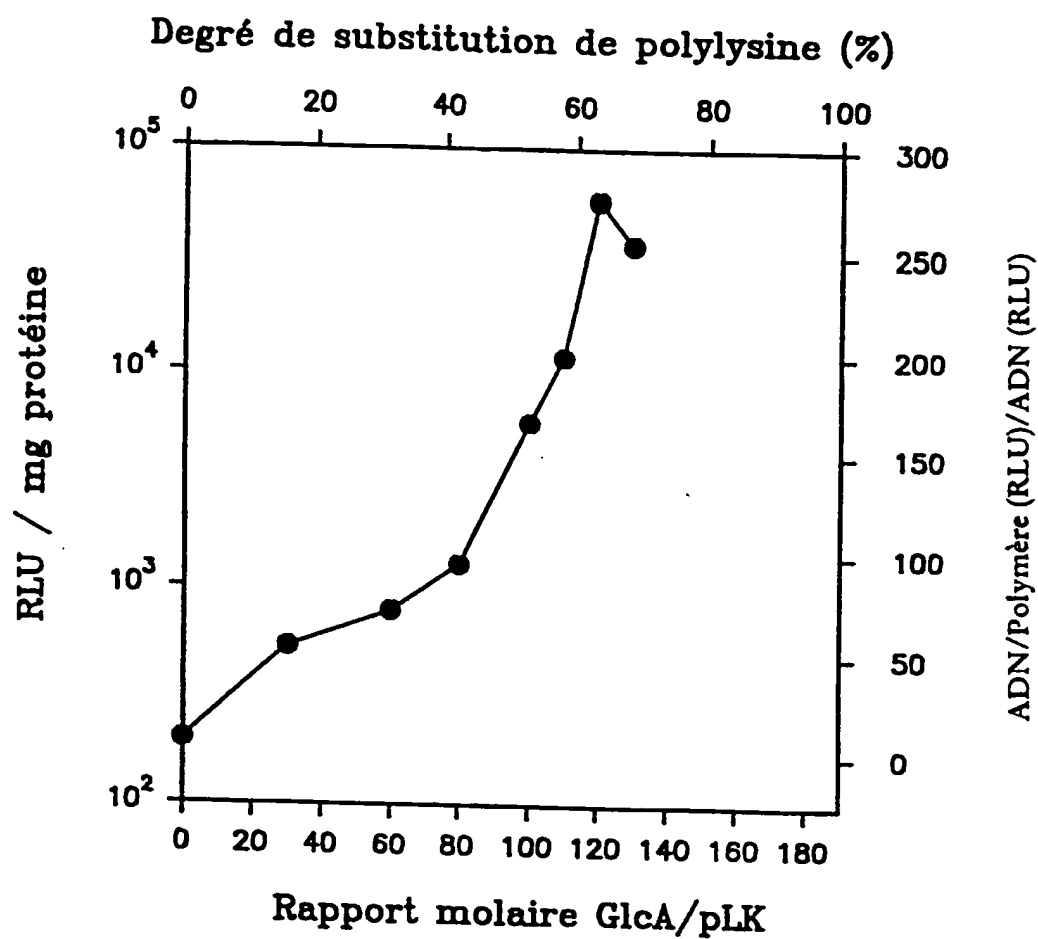


Figure 2a

5/17

HepG2

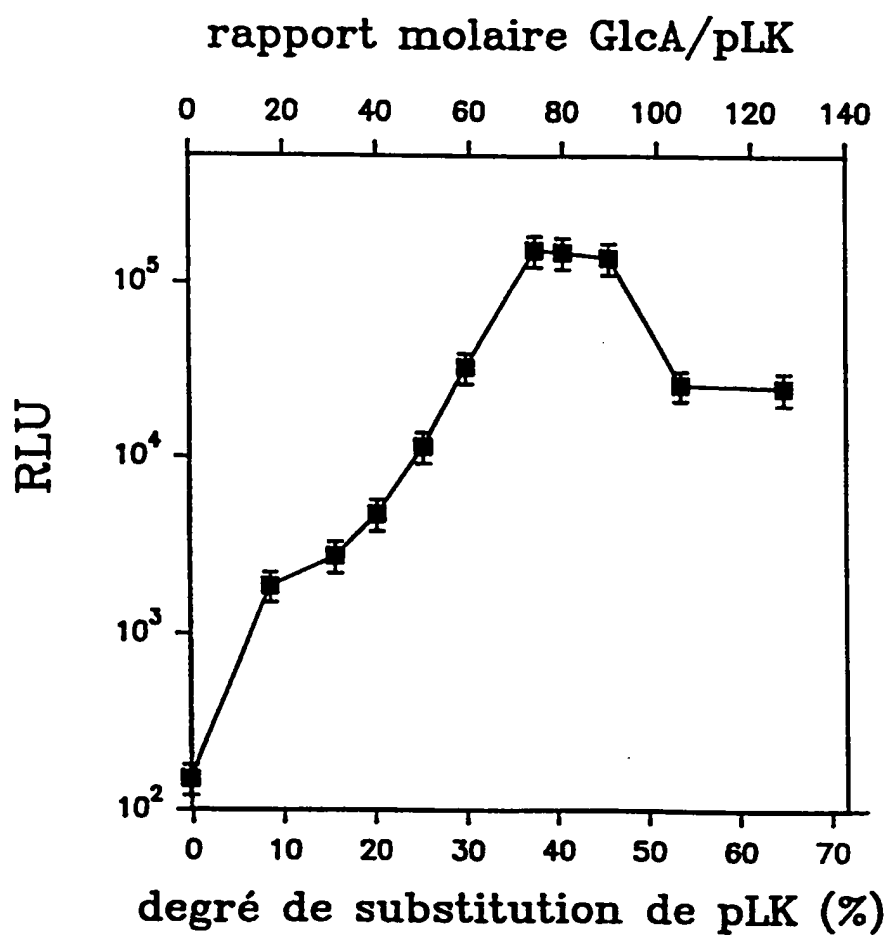


Figure 2b

6/17

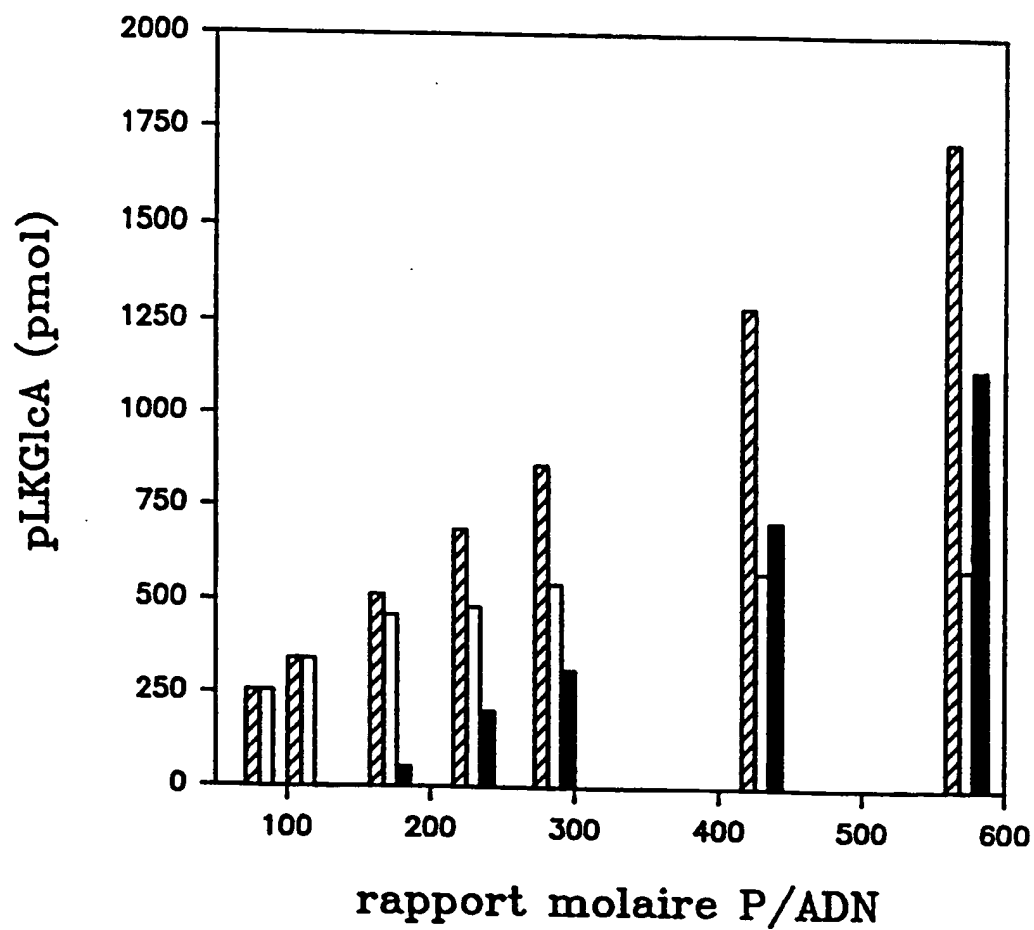


Figure 2c

7/17

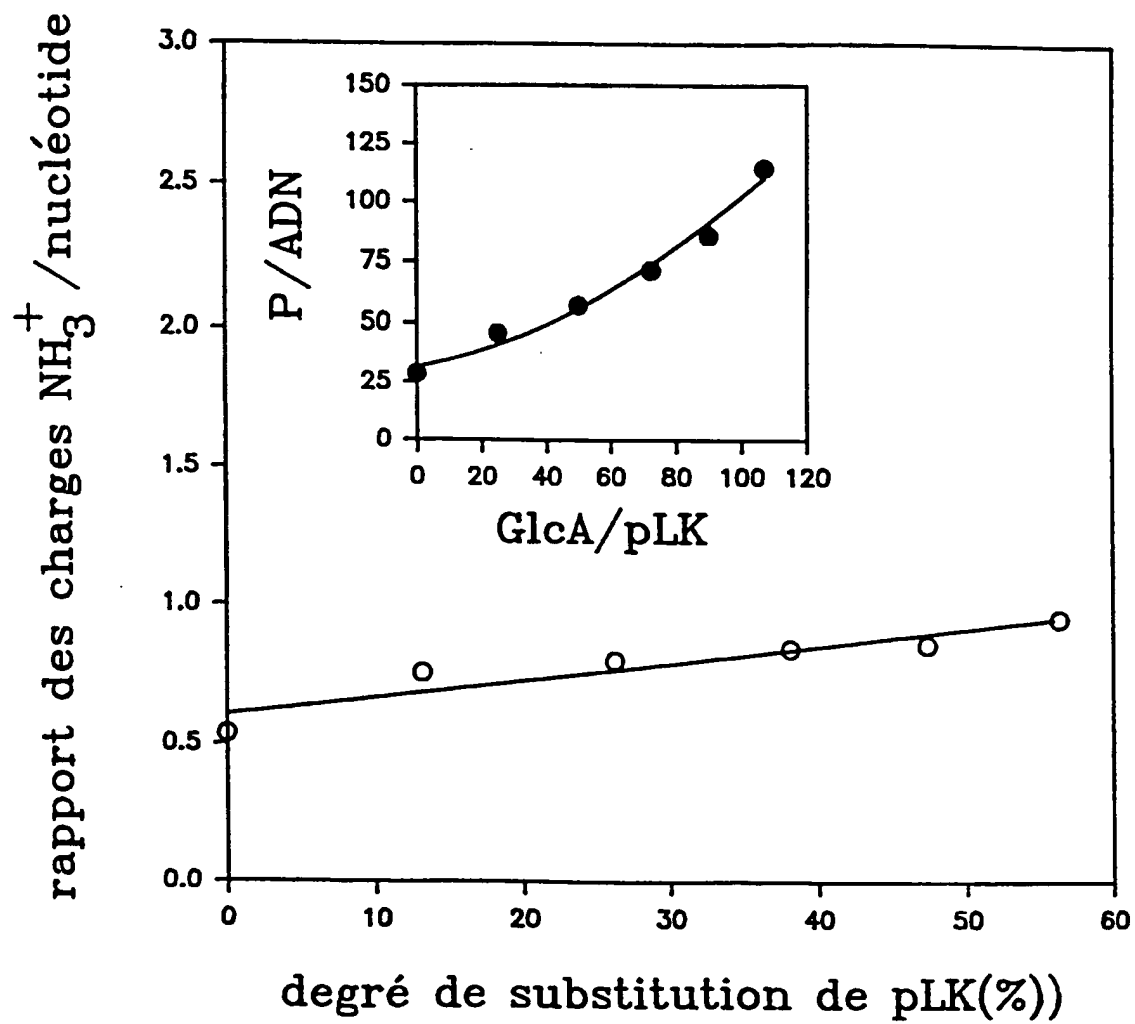


Figure 2d

8/17

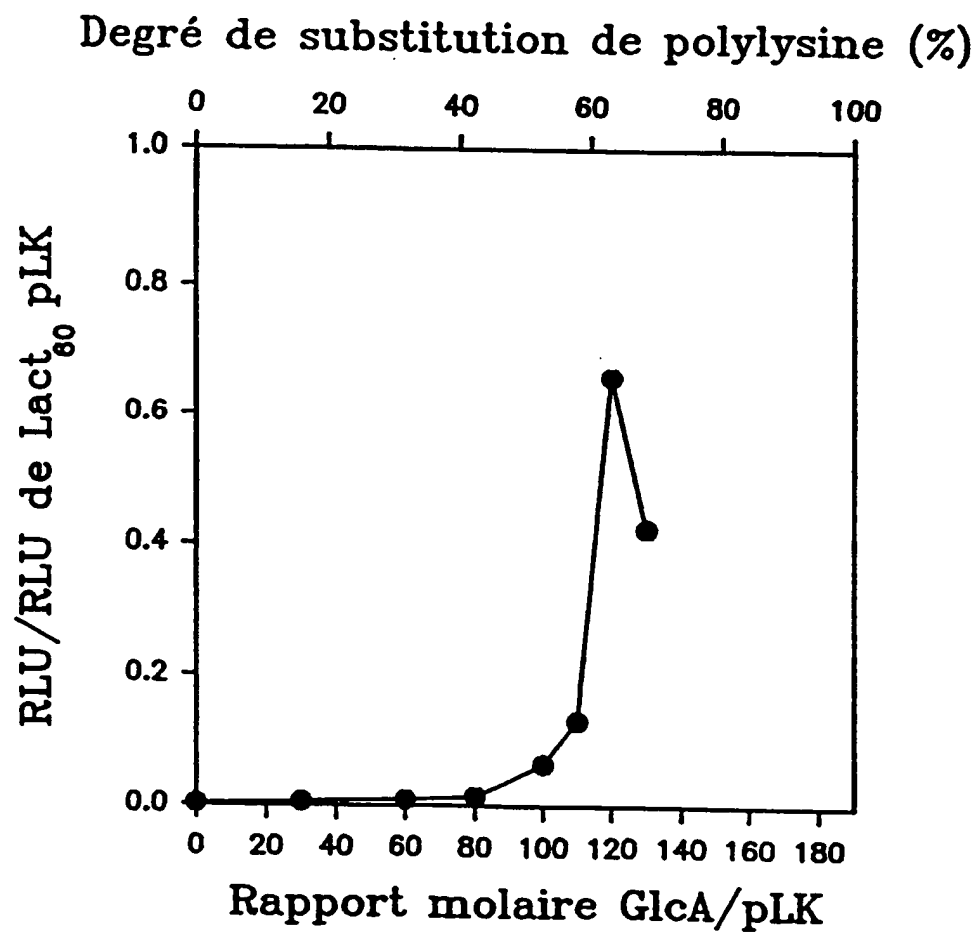


Figure 3a

9/17

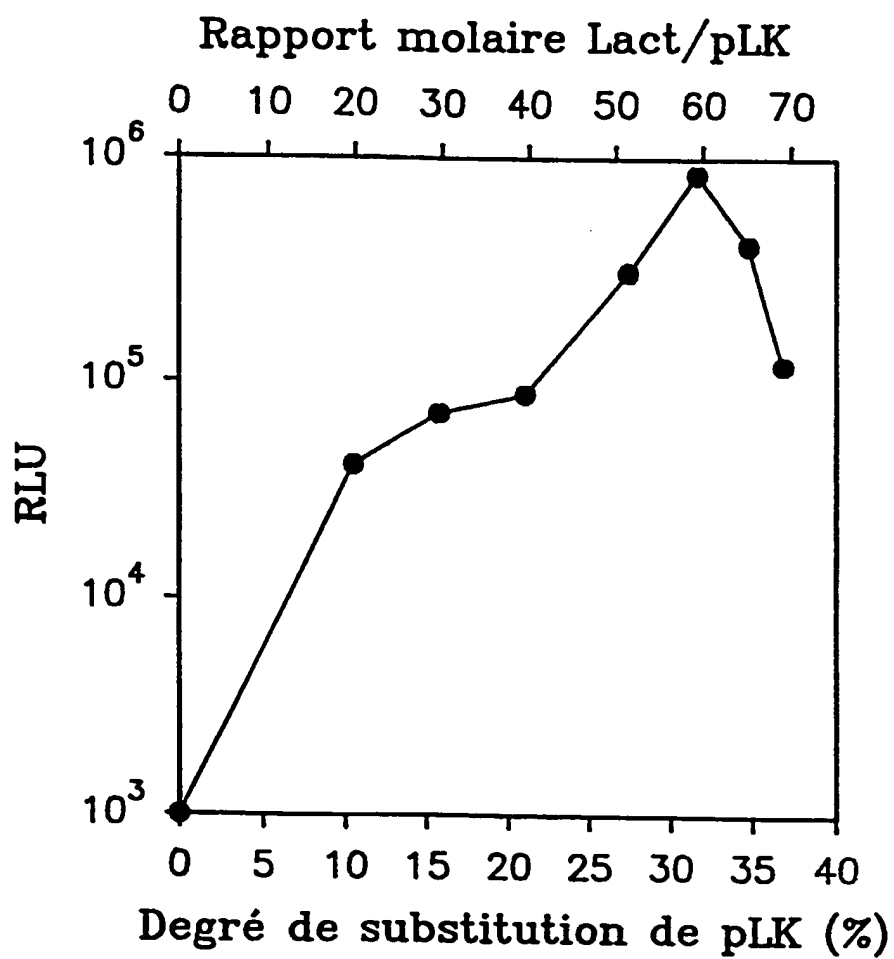


Figure 3b

10/17

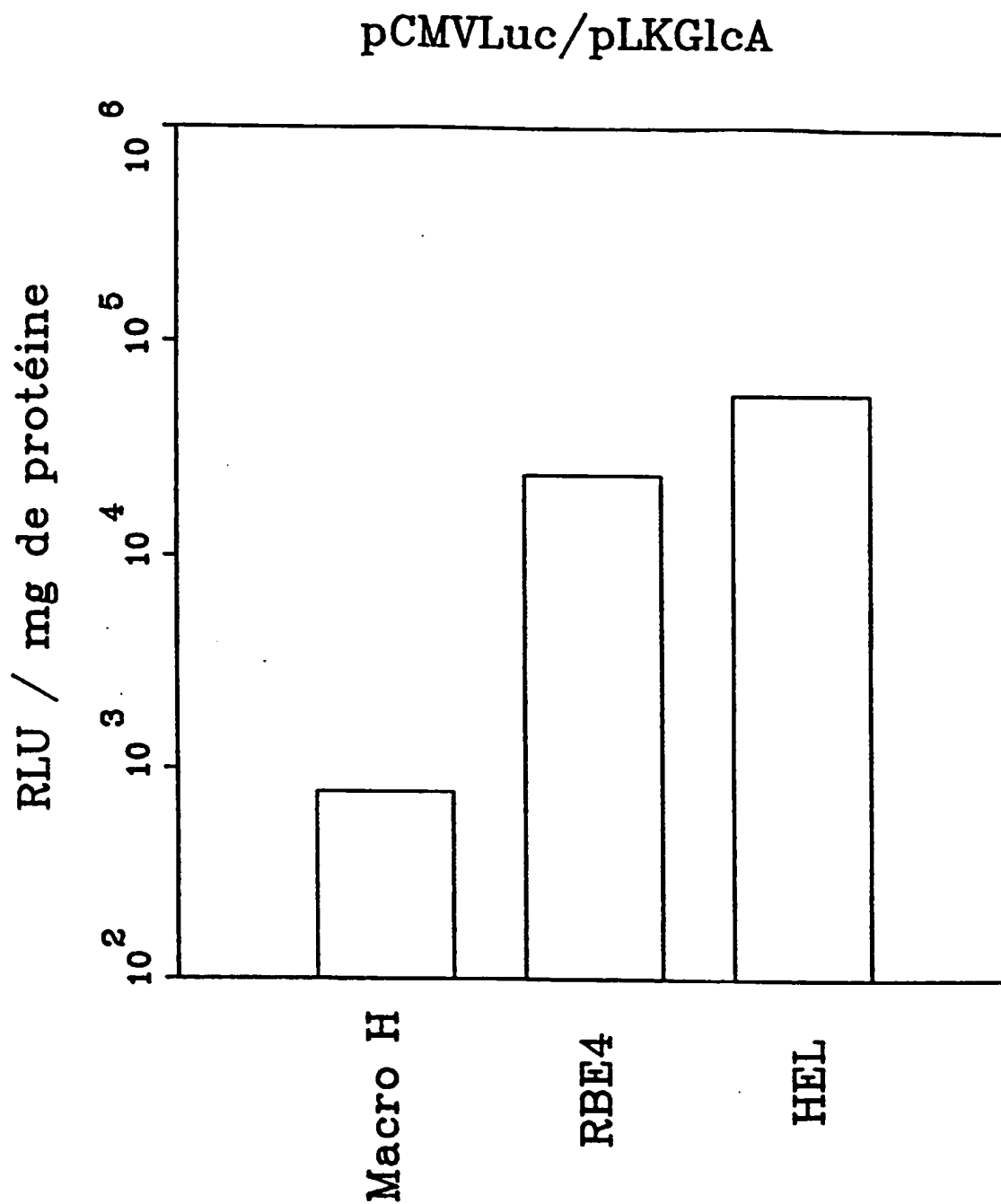


Figure 4

11/17

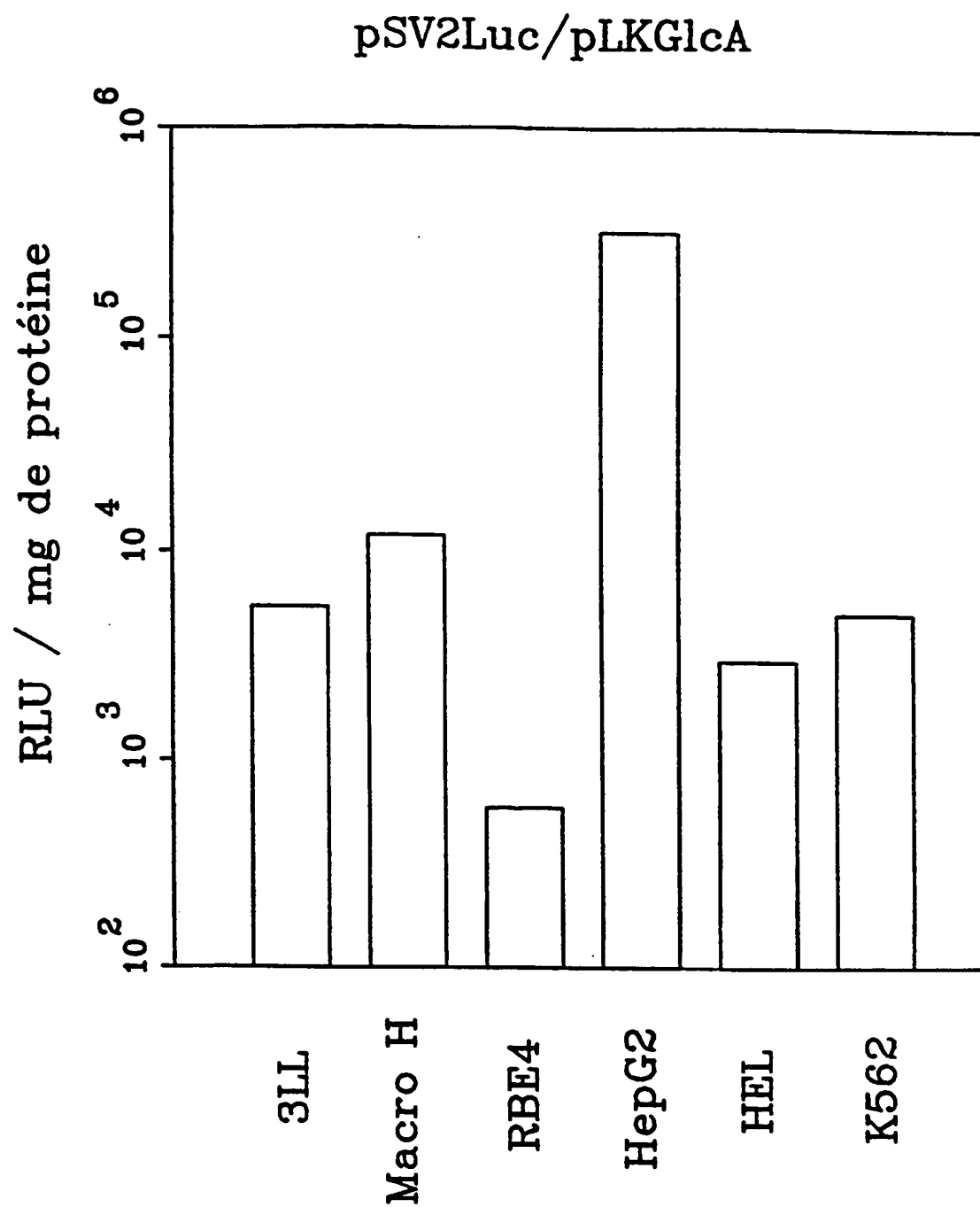


Figure 5

12/17

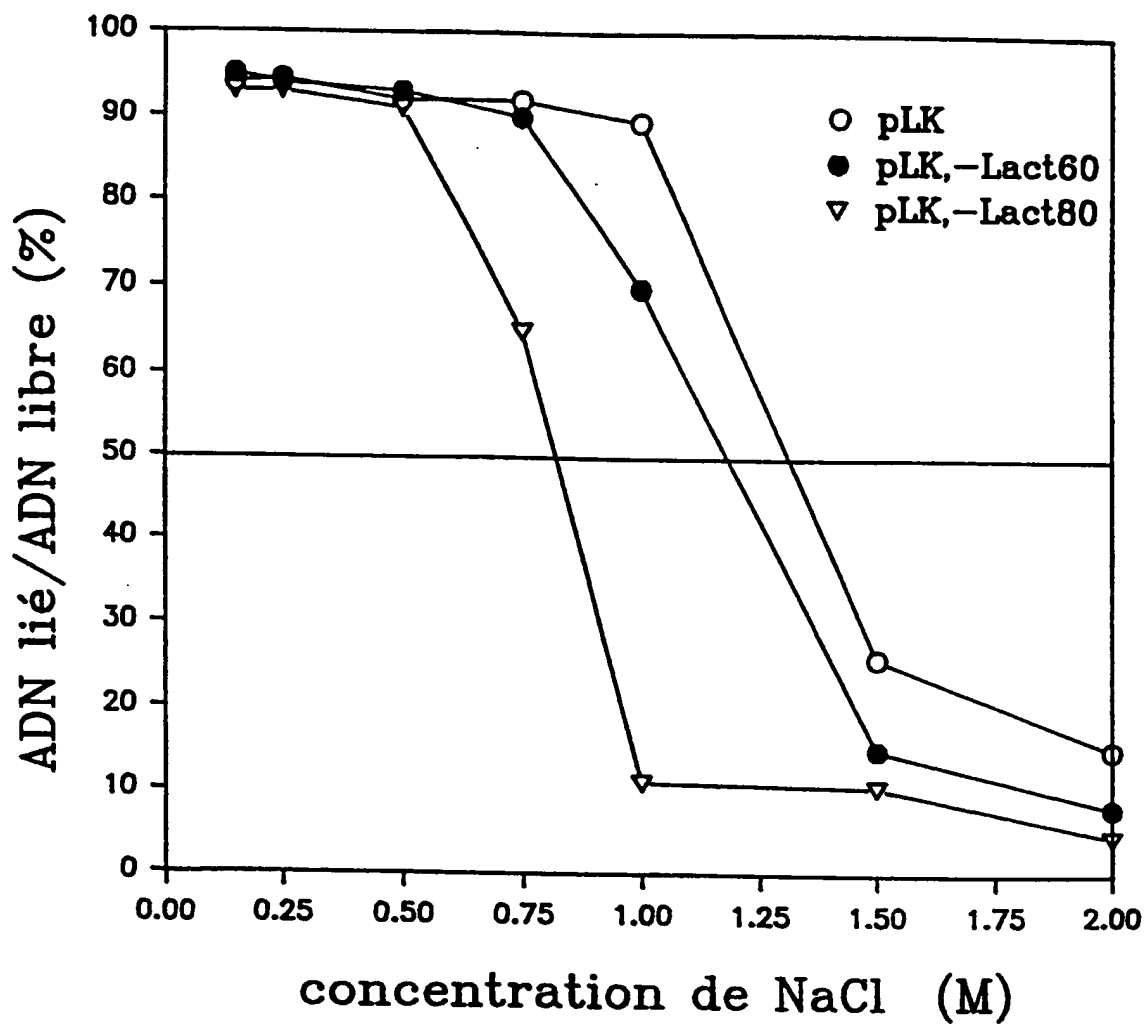


Figure 6

13/17

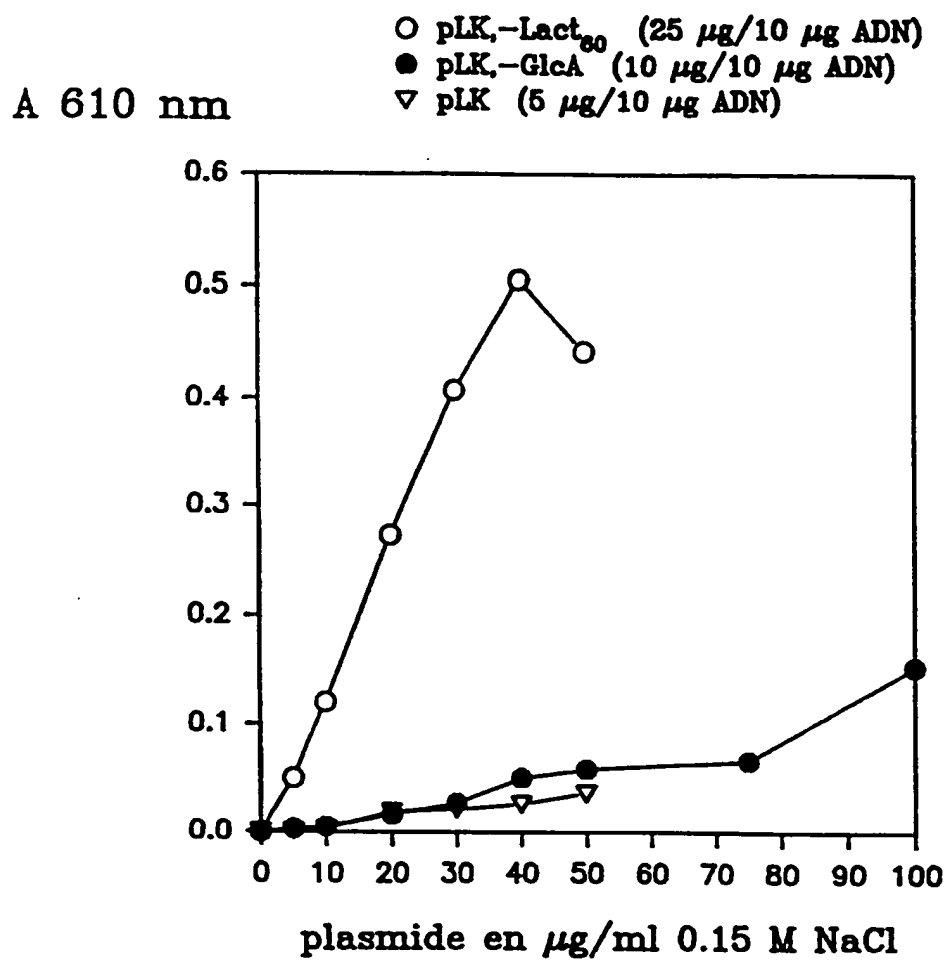


Figure 7a

14/17

A 610 nm

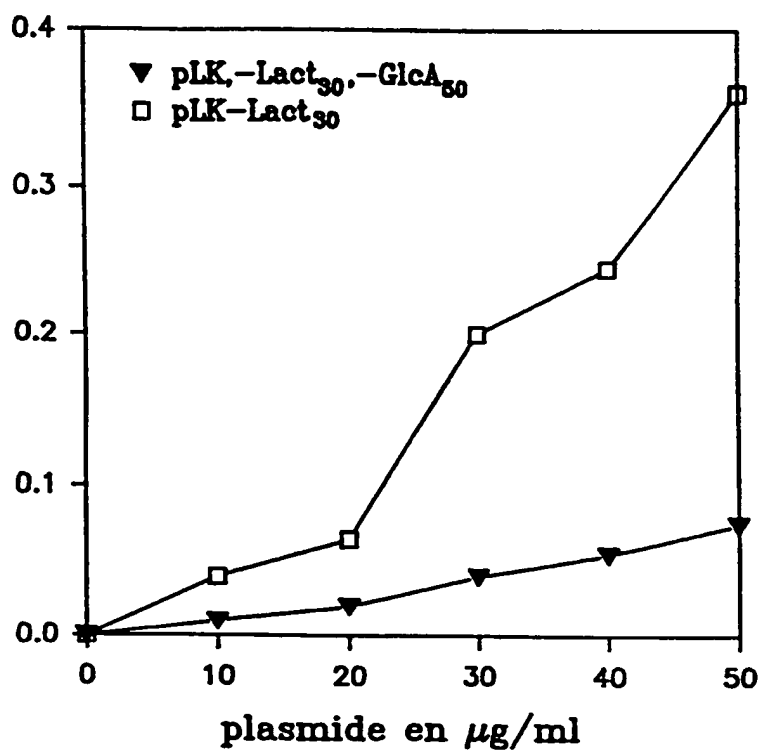


Figure 7b

15/17

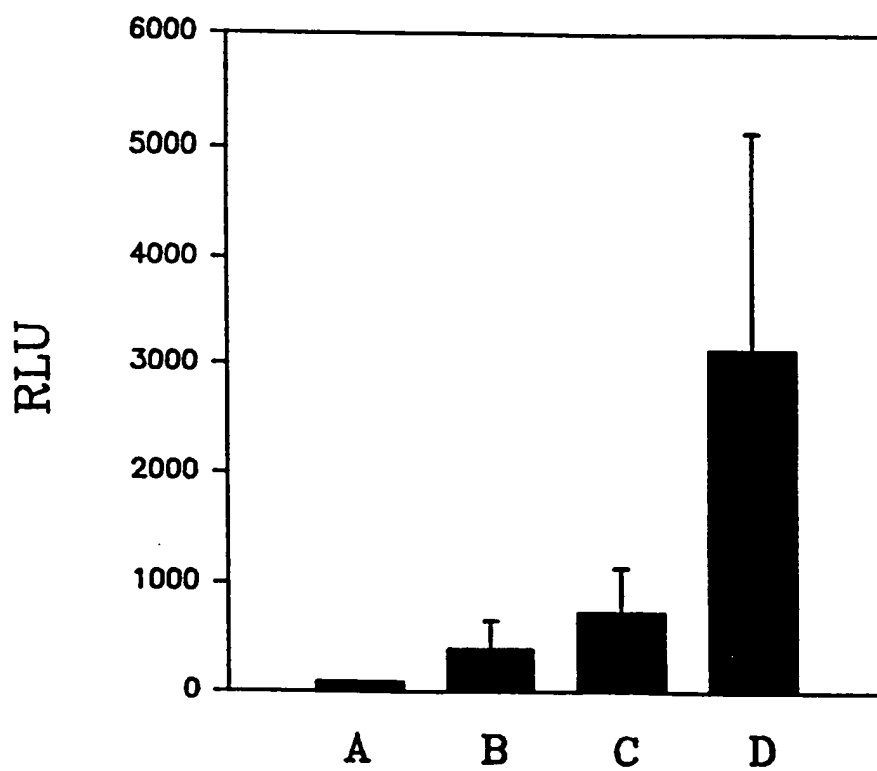


Figure 8

16/17

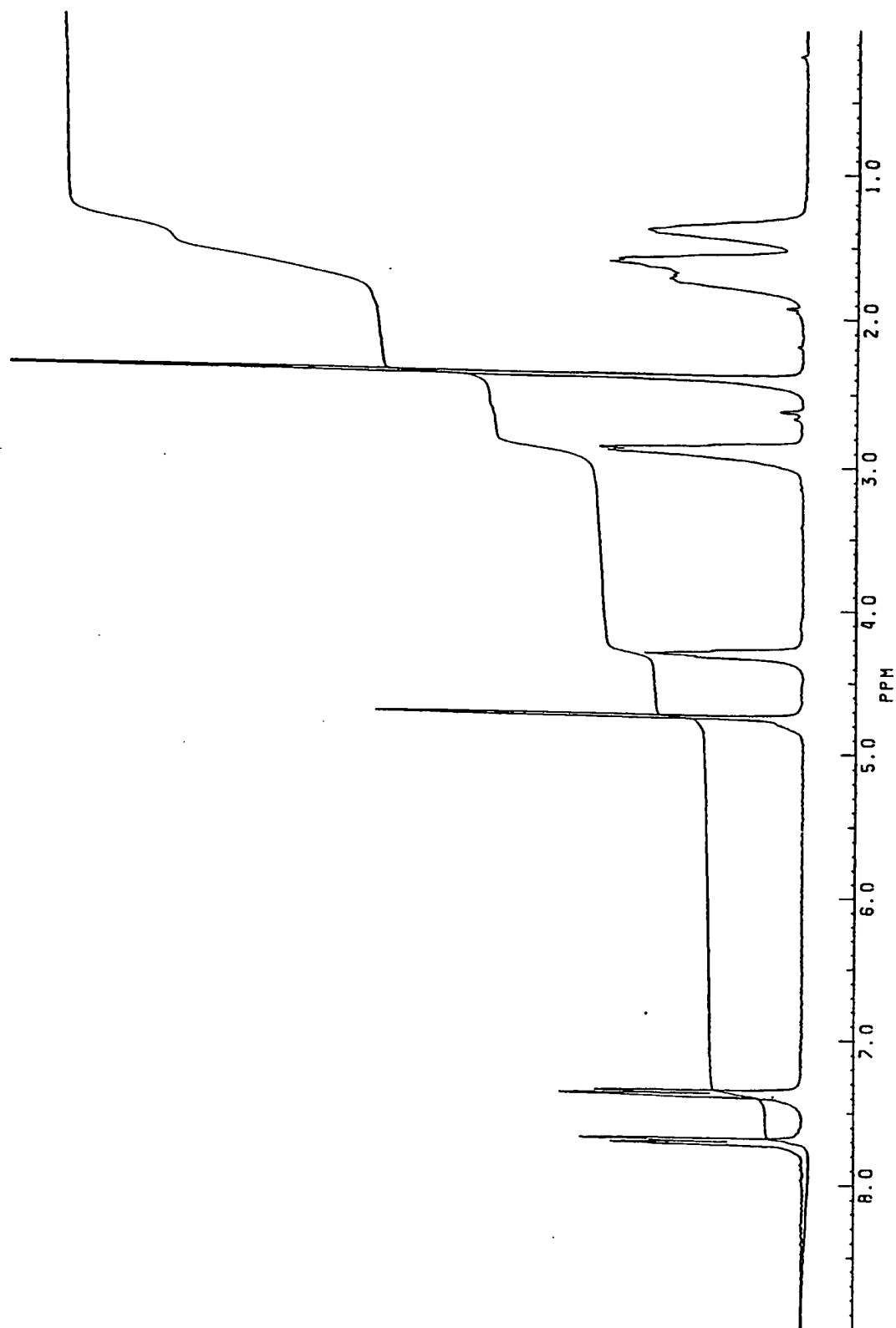


Figure 9

17/17

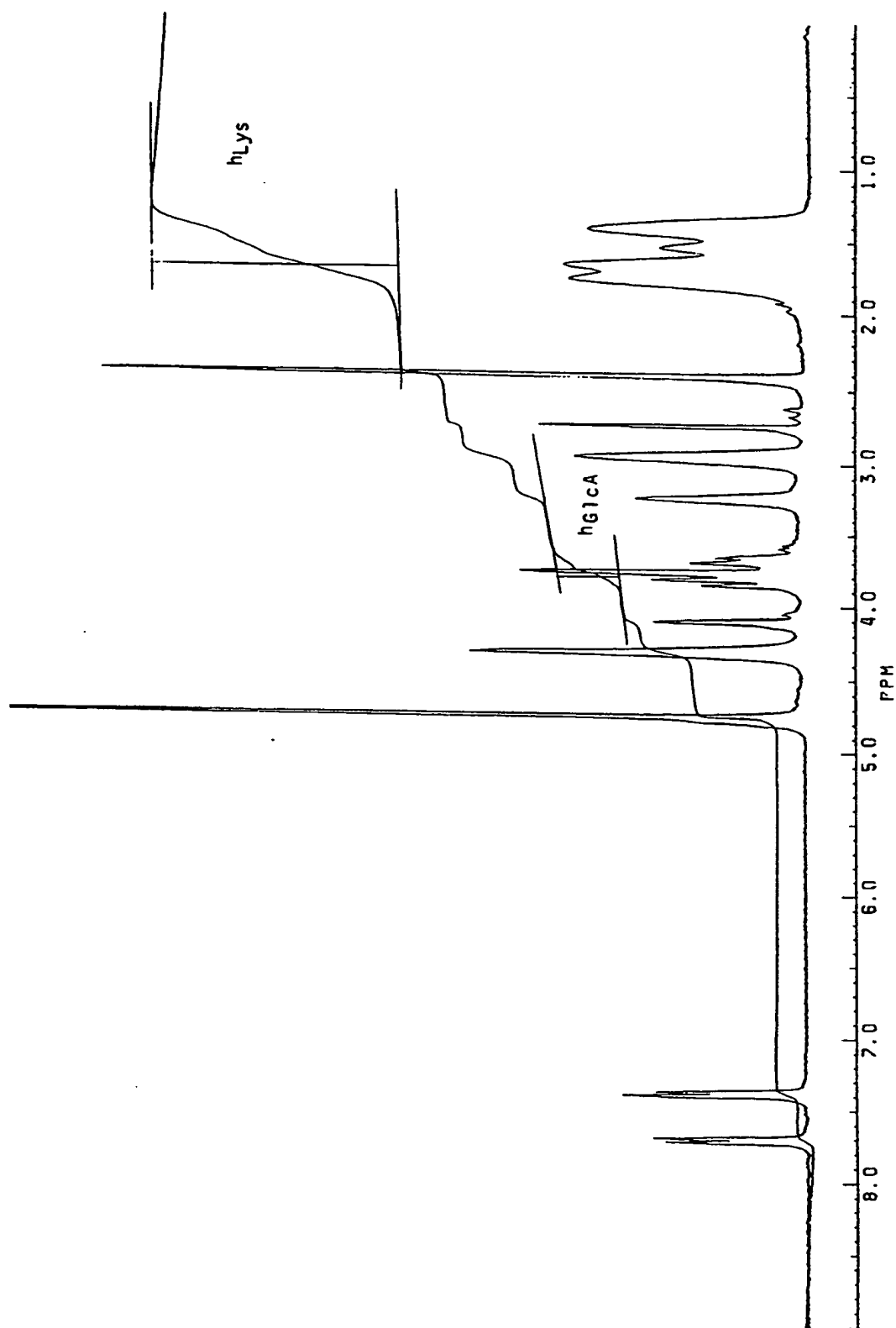


Figure 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/87 A61K47/48 A61K48/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO-A-92 13570 (BOEHRINGER INGELHEIM GMBH ET AL.) 20 August 1992	1-3,6-8, 12
Y	see examples 14-16	1-21
Y	TETRAHEDRON 49(32), 6991-7000, 6 August 1993 NEGRE, E. ET AL. 'Synthesis of an allopurinol riboside-mannosylated poly-L-lysine conjugate' see the whole document	1-21
Y	NUCLEIC ACIDS RES. 21(4), 871-8, 25 February 1993 MIDOUX, P. ET AL. 'Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells' cited in the application see the whole document	1-21
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 1995

Date of mailing of the international search report

19.09.95.

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00535

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 167, no. 3, 30 March 1990 DULUTH, MINNESOTA US, pages 1044-1049, MIDOUX, P. ET AL. 'Drug targeting: anti-HSV-1 activity of mannosylated polymer-bound 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine' see figure 1 ----	1-21
A	CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, vol. 4, no. 2, April 1992 pages 257-266, VARKI, A. 'Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins' cited in the application ----	11
T	ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 14, 1994 pages 1-24, MONSIGNY, M. ET AL. 'Glycoconjugates as carriers for specific delivery of therapeutic drugs and genes' see the whole document ----	1-21
T	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 6, July 1995 - August 1995 WASHINGTON US, pages 401-410, ERBACHER, P. ET AL. 'Glycosylated polylysine/DNA complexes: gene transfer efficiency in relation with the size and the sugar substitution level of glycosylated polylysines and with the plasmid size' see the whole document -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00535

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9213570	20-08-92	DE-A- 4104186	13-08-92
		EP-A- 0571414	01-12-93
		JP-T- 6504993	09-06-94

Dem Internationale No
PCT/FR 95/00535

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 167, no. 3, 30 Mars 1990 DULUTH, MINNESOTA US, pages 1044-1049, MIDOUX, P. ET AL. 'Drug targeting: anti-HSV-1 activity of mannosylated polymer-bound 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine' voir figure 1 ----	1-21
A	CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, vol. 4, no. 2, Avril 1992 pages 257-266, VARKI, A. 'Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins' cité dans la demande ----	11
T	ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 14, 1994 pages 1-24, MONSIGNY, M. ET AL. 'Glycoconjugates as carriers for specific delivery of therapeutic drugs and genes' voir le document en entier ----	1-21
T	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 6, Juillet 1995 - Août 1995 WASHINGTON US, pages 401-410, ERBACHER, P. ET AL. 'Glycosylated polylysine/DNA complexes: gene transfer efficiency in relation with the size and the sugar substitution level of glycosylated polylysines and with the plasmid size' voir le document en entier -----	1-21

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR 95/00535

WO-A-9213570

20-08-92

**Membre(s) de la
famille de brevet(s)**

4104186

Date de publication

13-08-92

01-12-93

09-06-94